

UNIVERSITE DE CLERMONT
FACULTE DE PHARMACIE

Année 1971

N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Marie - Christine CLUZEL née SOULA

Pharmacien

née le 18 Mai 1942 à Pau (64)

Présentée et soutenue publiquement le 23 Juin 1971

CONTRIBUTION A L'ETUDE BIOCHIMIQUE DE L'ACTIVITE
DES ANTHOCYANOSIDES SUR LE METABOLISME RETINIEN
ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES ENZYMATIQUES RETINIENNES

Président du Jury : M. BASTIDE Professeur

Membres du Jury : M. TRONCHE Professeur

Mme GAILLARD Professeur

Suppléant : M. BOYER

UNIVERSITE DE CLERMONT

Président de l'Université : M. KOHLMULLER
Vice-Président : M. LEMOSSE
Secrétaire Général : Mme CHOPART

FACULTE DE PHARMACIE

(U.E.R. de PHARMACIE)

Doyen : M. COULET
Vice-Doyen : Mme GAILLARD
Professeurs honoraires : Mme BLANQUET
M. VAURS

I - PROFESSEURS TITULAIRES

MM. BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BERGER	Chimie Analytique
CLUZEL	Bactériologie
COULET	Botanique et Microbiologie
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
FEBVRE	Pharmacie Galénique
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
MM. POURRAT	Matière Médicale
TRONCHE	Pharmacie Chimique

II - PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mle CHATONIER	Chimie Minérale et Minéralogie
Mme POURRAT	Matière Médicale

III - MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. ANDRAUD	Toxicologie
COUQUELET	Pharmacie Chimique
Mme PETIT	Chimie Analytique

IV - DELEGUES DANS LES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. AIACHE
BOYER
GUILLLOT

Pharmacie Galénique
Chimie Biologique
Botanique

Attaché Principal : M. BERTHON
Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation (Délibération du 6 Juin 1956).



AVANT - PROPOS

S'il est un usage bien établi, c'est dans tout avant-propos de témoigner sa profonde reconnaissance à des titres divers à tous ses maîtres de la Faculté.

Je m'y sou mets d'autant plus volontiers qu'il ne s'agit pas pour moi, d'une simple formalité et que ma gratitude est certaine à l'égard de tous ceux qui m'ont guidée dans mes études. Je suis heureuse de pouvoir la leur exprimer ici.

Plus particulièrement, si possible, à Madame le Professeur BLANQUET qui par ses conseils bienveillants a dirigé mes débuts; à Monsieur le Doyen Meyniel pour son amicale sollicitude à mon égard; à Monsieur le Professeur TRONCHE qui a bien voulu m'associer à certains de ses travaux et qui avec Madame le Professeur GAILLARD m'a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail et enfin plus spécialement à Monsieur le Professeur BASTIDE qui m'a ouvert les portes de son laboratoire, m'a dirigée avec bienveillance lorsque je débute dans la recherche, m'a inspiré le sujet de cette thèse qui n'aurait jamais vu le jour sans ses conseils et son amicale direction.

Un autre usage voudrait que je mentionne ici mes parents et ma famille mais là je ne m'y conformerai pas car ils sont certains de mon affection.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PLAN

Pages

CHAPITRE I - Recherches Bibliographiques

I - ANTHOCYANOSIDES EXTRAITS DE VACCINIUM

MYRTILLUS	4
A - Du point de vue analytique	4
a) Etat naturel	4
b) Structure et propriétés chimiques ...	5
B - Du point de vue toxicologique	5
a) Chez l'animal : 1/ Toxicité aigüe ...	5
2/ Toxicité chronique	6
3/ Essais tératogènes	6
b) Chez l'homme	6
C - Du point de vue pharmacodynamique	6
a) Effets généraux	6
1/ Etude de la pression artérielle ..	6
2/ Etude de la diurèse	6
3/ Etude de la glycémie	7
4/ Etude sur le coeur isolé	7
5/ Etude sur le système nerveux	7
b) Activités angio-protectrices	8
Etude des tests permettant de mettre	
en évidence l'action angio-protectri-	
ce des anthocyanosides	
- Test au bleu trypan	8
- Test à la ventouse	8
- Test à la lactate déshydrogénase .	9
- Test de Beach & Steinetz	9
- Test de Lefebvre	9
c) Anthocyanosides et adaptation à	
l'obscurité	9
1/ Etude histochimique	9
2/ Etude biochimique ..	10
3/ Etude électrorétinographique	11
4/ Etude histoenzymologique	11

	Pages
D - Du point de vue clinique	11
a) En médecine générale	12
b) En ophtalmologie	12
c) En stomatologie	12
II - RAPPELS PHYSIOLOGIQUES DE LA RETINE	13
Effets de la lumière sur la rétine	
A - L'hypothèse enzymatique	14
B - L'hypothèse de l'état solide	14
C - L'hypothèse ionique	15

CHAPITRE II - Recherches expérimentales

- GENERALITES : . Moyens d'études	19
. Expression des résultats .	20
- ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE	22
- ACTIVITE α HYDROXYBUTYRATE DESHYDROGENASIQUE	29
- ACTIVITE 6 PHOSPHO GLUCONATE DESHYDROGE- NASIQUE	33
- ACTIVITE GLUCOSE 6 PHOSPHATE DESHYDROGE- NASIQUE	37
- ACTIVITE α GLYCERO PHOSPHATE DESHYDROGE- NASIQUE	41
- ACTIVITE PHOSPHOGLUCOMUTASIQUE	46
- ACTIVITE 5 NUCLEOTIDASIQUE	50
- ACTIVITE GLUCOSE 6 PHOSPHATASIQUE	54
- ACTIVITE PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASIQUE	59
- ACTIVITE A. T. PASIQUE	63

CHAPITRE III -

- RESUME ET CONCLUSIONS	69
- BIBLIOGRAPHIE	71

Chapitre I

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années le laboratoire de chimie biologique et de pharmacodynamie de la faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand, s'est intéressé à la prospection de l'équipement enzymatique de nombreux milieux biologiques. Il nous a été ainsi proposé d'étudier les variations des quelques activités enzymatiques rétiniennes sous l'influence d'un facteur pharmacologique : les anthocyanosides.

Notre travail se subdivisera en deux parties suivies d'une conclusion générale.

- La première partie sera consacrée aux recherches bibliographiques sur les anthocyanosides et quelques rappels physiologiques sur la rétine.

- La deuxième partie sera consacrée aux recherches expérimentales.

I - ANTHOCYANOSIDES EXTRAITS DE "VACCINIUM MYRTILLUS"

Les anthocyanosides extraits de *vaccinium myrtillus* sont des substances angioprotectrices douées d'activité vitaminique P.

Ils correspondent au brevet d'invention n° 1300869 (121) et sont déjà présents dans les préparations dénommées (69) (70) (161) que les laboratoires CHIBRET ont spécialisées sous les marques déposées de : DIFRAREL 20, DIFRAREL 100, DIFRAREL E, DIFRAREL B, DIFRAREL Sédatif.

De la littérature consacrée aux anthocyanosides de *vaccinium myrtillus* (147) (148) (9) (12) (186) (187) nous dégageons les quelques points suivants qui complètent l'étude des facteurs angio-protecteurs (8) (33) (39) (61) (62) (104) (130) (131) (132) (180).

A) Du point de vue analytique

a) ETAT NATUREL

Les anthocyanes existent dans la nature soit sous forme libre, soit à l'état d'hétérosides appelés anthocyanosides; ils constituent les pigments que l'on trouve dans de nombreux organes de plantes principalement dans les fleurs et les fruits; ils sont, non seulement bleus, mais encore rouges ou violets.

C'est à partir d'une source naturelle riche en de tels composés, les baies de myrtilles que sont isolés les anthocyanes.

La composition chimique des baies de myrtilles (*vaccinium myrtillus*) a été étudiée en particulier par REYNOLDS & ROBINSON (156), SUOMALAINEN (160) (161), WILLSTATTER (197), KARRER (97), ICE (88). Ces auteurs signalent la présence de glucosides de cyanidine, de malvidine, de delphinidine et de pétunidine. Ces constituants ne sont pas toujours isolés mais souvent mis seulement en évidence par chromatographie sur papier après extraction par le méthanol chlorhydrique, suivie d'une précipitation par l'éther

b) STRUCTURE ET PROPRIETES CHIMIQUES

Les anthocyanosides, isolés de *vaccinium myrtillus*, sont formés d'un mélange d'hétérosides de cyanidol, de delphinidol de malvidol et de pétunidol. Les sucres mono ou diholosides sont constitués par du glucose galactose rhamnose, et fixés en position 3 ou 5

Jusqu'en 1962 l'absence de techniques industrielles d'extraction avait empêché leur emploi en thérapeutique. Mis au point par le Professeur POURRAT et les laboratoires CHIBRET, un procédé breveté a permis l'isolement des anthocyanosides de *vaccinium myrtillus*, sous forme stable, hydrosoluble, avec des rendements élevés

B) Du point de vue toxicologique

D'après CHIBRET (40) les données toxicologiques sont les suivantes :

a) CHEZ L'ANIMAL

1/ Toxicité aigüe

Les $DL_{50}^{(*)}$ des glycosides d'anthocyanes obtenues par différentes voies d'introduction et sur deux espèces animales sont les suivants, après calculs selon la méthode de Karler et Belnens.

	SOURIS	RAT
Voie orale D.L. 50	n'a pu être déterminée	n'a pu être déterminée
Voie orale D.L. 50	supérieure à 25 g / Kg	supérieure à 20 g / Kg
Voie intra-dermique D.L. 50	4,11 g / Kg	2,35 g / Kg
Voie intra-veineuse D.L. 50	0,84 g / Kg	0,24 g / Kg

(*) DL_{50} : dose produisant 50 % de mortalité.

2/ Toxicité chronique

Expérimentalement aucune lésion anatomo-pathologique n'a pu être mise en évidence chez les animaux traités pendant une durée de trois mois, même avec des doses très élevées (10 fois la dose thérapeutique).

3/ Essais tératogènes

Expérimentalement aucune lésion tératogène n'a pu être mise en évidence et cela après trois générations successives sur trois espèces animales différentes.

b) CHEZ L'HOMME

Le fruit comestible qui sert à l'extraction des anthocyanosides est dépourvu de toute toxicité. Par ailleurs aucun syndrome d'hypervitaminose P n'a été décrit.

C) Du point de vue pharmacodynamique

a) EFFETS GENERAUX (148)

1/ Etude de la pression artérielle et de la respiration du lapin après administration de glycosides d'anthocyanes

L'administration d'une solution de glycosides d'anthocyanes par voie bucale (5g/Kg) ou par injection intrapéritonéale (500mg/Kg) n'entraîne pas de modification de la pression artérielle ni des mouvements respiratoires, seule l'injection intra-veineuse (100 à 200 mg/Kg) d'une solution de glycosides d'anthocyanes peut produire une légère hypotension fugace, la pression redevenant très rapidement normale dès la fin de l'injection. Le phénomène peut s'expliquer par le mode d'administration (voie intra-veineuse).

2/ Etude expérimentale du pouvoir diurétique éventuel des glycosides d'anthocyanes chez le lapin :

GALLI (70) : "l'injection intra-veineuse de 25 mg/

Kg de poids, d'anthocyanosides a montré sur le lapin dans les conditions expérimentales, un pouvoir diurétique. L'élimination de l'urée est du même ordre que celle produite par la théophylline".

3/ Action des glycosides d'anthocyanes sur la glycémie : GALLI (70) : "Les anthocyanosides ne présentent pas d'effet hypoglycémiant chez le lapin".

4/ Etude de l'action des glycosides d'anthocyanes sur le coeur isolé de lapin : "Dans les conditions expérimentales où nous nous trouvions, les anthocyanosides possèdent une faible action vasodilatatrice; celle-ci semble en première approximation environ 50 fois plus faible que celle produite par l'adénosine".

5/ Etude de l'action des glycosides d'anthocyanes sur le système nerveux central (148)

Les glycosides d'anthocyanes présentent une action sédative qui a été recherchée par les tests suivants :

+ effets sur la mobilité spontanée de la souris (actinographie). L'action est nette à la dose de 500 mg/Kg per os.

+ effets vis-à-vis de l'action sédative de la chlormazine (1 mg/Kg) chez la souris : nets à la dose de 500 mg/Kg per os.

+ effets vis-à-vis de l'action hypnotique du pentobarbital (1 mg/Kg) chez la souris : légers à la dose de 500 mg/Kg per os.

+ effet sédatif central vis-à-vis du pentobarbital (25 mg/Kg) chez le rat : les glycosides d'anthocyanes à la dose de 10 mg/Kg en intra-péritoneal administrés au réveil de l'animal prolongent le sommeil de 38 minutes par animal, alors que les témoins recevant du soluté isotonique ne se rendorment pas.

b) ACTIVITES ANGIO-PROTECTRICE

L'activité angio-protectrice peut être mise en évidence par des tests biologiques permettant :

- soit d'objectiver un renforcement de l'étanchéité de la paroi des capillaires sanguins cutanés préalablement fragilisés par un régime approprié : test au bleu trypan,
- soit d'objectiver un renforcement de la résistance de la paroi des capillaires : test à la ventouse,
- soit de mettre en évidence une diminution de la libération sérique de la lactate déshydrogénase et de ses isoenzymes cardiaques chez le rat soumis à une épreuve de nage.

TEST AU BLEU TRYPAN

Technique : On utilise la méthode d'AMBROSE et de EDS (7) modifiée (9). Au moment de l'expérience on injecte par voie intra-veineuse au lapin albinos convenablement carencé, 2 ml d'une solution à 1% de bleu trypan. Sur la peau de la région abdominale soigneusement lésée, on applique pendant 30 secondes des tampons imbibés de chloroforme afin de créer une irritation locale qui favorise la diffusion du colorant hors des capillaires vers les liquides interstitiels. Une tache bleue apparaît à l'endroit irrité. Le temps qui s'est écoulé entre le moment de l'application du tampon et celui de l'apparition de la tache est raccourci chez l'animal carencé. Il est augmenté après administration de facteurs vitaminiques P.

Résultats : Les anthocyanosides ont une activité vitaminique P particulièrement élevée. Celle-ci se manifeste quelle que soit le mode d'introduction : voie orale, intra-veineuse, intra-péritonéale, rectale.

TEST A LA VENTOUSE

Il permet d'étudier l'action renforçatrice d'une substance en mesurant la résistance capillaire en fonction des variations de pression.

TEST A LA LACTATE DESHYDROGENASE (117)

Technique : Des rats mâles, lestés au thorax par une tare égale au 1/20 du poids corporel sont soumis à une épreuve de nage. Certains animaux reçoivent des anthocyanosides par voie orale 30 minutes avant l'épreuve, d'autres servent de témoins. Après sacrifice, la L.D.H. est déterminée par la méthode de CABAUD et WROBLEWSKI (35) modifiée par BASTIDE et coll. (10). Les isoenzymes de la L.D.H. ont été déterminés selon FISHER et NIXON (64) après migrations sur acétate de cellulose à l'aide de l'électrophorèse microzome BECHMAN suivie d'une révélation sur gel d'agar-agar.

Résultats : Après épreuve de nage nous voyons apparaître dans le sérum les isoenzymes d'origine cardiaque accompagnées d'une élévation de l'isoenzyme musculaire chez l'animal témoin alors que, après traitement par les anthocyanosides, les auteurs relèvent une nette inhibition du passage de ces isoenzymes dans le sérum.

DEUX NOUVEAUX TESTS basés sur les effets des anthocyanosides sur la perméabilité capillaire mettent en évidence le premier ou test de BEACH & STEINETZ (17) une élimination moins importante du colorant dans la circulation après administration d'anthocyanosides, le second ou test de LEFEBVRE (106) un accroissement du temps d'apparition du colorant, dans les mêmes conditions on a pu, grâce aux résultats obtenus, classer par ordre d'activité décroissante :

- anthocyanosides,
- citroflavonoïdes,
- rutine hydrosoluble.

Les anthocyanosides sont très supérieurs aux autres facteurs vitaminiques P.

c) ANTHOCYANOSIDES ET ADAPTATION A L'OBSCURITE

1/ Etude histochimique : Action des glycosides d'anthocyanosides sur le pourpre rétinien

D'après JAYLE & AUBERT (91) les glycosides d'anthocyanes augmentent l'acuité visuelle en lumière mésopique. Les travaux réalisés à l'Institut CHIBRET, basés sur la méthode his-

tochimique préconisée par KARLI (95) sur la coloration électrique du pourpre rétinien au bleu lumière, ont permis de mettre en évidence l'effet des anthocyanosides sur le pourpre rétinien (148) (40) :

- chez les animaux adultes (dix cobayes et dix rats) après administration intrapéritonéale durant dix jours consécutifs, l'examen des coupes histologiques colorées selon KARLI montre chez les animaux traités un article externe des bâtonnets colorés en bleu intense et beaucoup plus large, donc beaucoup plus riche en pourpre que chez les animaux témoins. Les auteurs signalent aussi la différence de sensibilité qui existe entre les cobayes chez lesquels seule la dose maximum de 100 mg/kg par jour a donné des résultats positifs alors que les rats nécessitent une dose de 5 mg/kg par jour pour obtenir un résultat positif
- chez les rats nouveaux nés un traitement identique a été réalisé au bout du dixième jour la différenciation de l'article externe des bâtonnets n'a pas paru influencé, par contre au vingtième jour le pourpre rétinien serait plus abondant, plus dense et mieux organisé que chez les témoins.

2/ Etude biochimique

En utilisant la technique de KIMURA (98), HANO & MATSUMITA (81) ont montré que le taux de régénération du pourpre rétinien était augmenté, in vitro, chez la grenouille, par les glycosides d'anthocyanes.

Une expérimentation a été réalisée sur plus de 200 lapins de la façon suivante : des animaux traités par voie intra-veineuse et des animaux témoins sont éblouis, puis mis à l'obscurité un temps plus ou moins long, avant d'être sacrifiés. Sur des rétines, prélevées à l'obscurité, le pourpre rétinien a été extrait à la digitonine, puis dosé par photométrie.

Cette expérimentation aboutit à la conclusion que les anthocyanosides favorisent la régénération du pourpre rétinien au cours des premières minutes d'adaptation.

3/ Etude électrorétinographique

Nous pouvons rappeler ici les travaux effectués par ALFIERI & SOLE (4) (5) (6) sur l'adaptorétinogramme du lapin. Les auteurs ont dégagé de cette expérimentation des conclusions très probantes qu'il faut citer :

"Les anthocyanosides, par voie parentérale, favorisent l'adaptation à l'obscurité du lapin, comme en témoignent les A.E.R.G. (*) point plus précoce, valeurs du rapport b2/b1 plus élevées. Il semble de plus que les anthocyanosides agissent là par un mécanisme propre et non pas en tant que facteurs vitaminiques P puisque les A.E.R.G. pratiqués avant et après la prise de tous les autres facteurs vitaminiques P purs, ne montrent pas de différence significative".

4/ Etude Histo-enzymologique

Des travaux histo-enzymologiques ont été effectués par WEGMANN TRONCHE & BASTIDE (194) et portent sur le dosage d'une vingtaine d'activités enzymatiques rétiniennes chez le lapin, après injection d'anthocyanosides. De ces travaux, les auteurs tirent les conclusions suivantes : "Sans pouvoir démontrer que la quantité totale de pigment visuel est augmentée, on peut du moins admettre que l'intensité des réactions concourant à sa formation est très notablement stimulée métaboliquement. Du moins on démontre très nettement que les anthocyanosides sont très actifs in vitro".

D) Du point de vue clinique

D'après les travaux de nombreux auteurs parmi lesquels TERRASSE, JAYLE, ROUHER (20) (21) (23) (47) (53) (71) (73) (90) (91) (124) (125) (145) (192) on a reconnu, pour les anthocyanosides, de nombreuses indications cliniques, tant en médecine générale qu'en ophtalmologie et plus récemment en stomatologie.

(*) A.E.R.G. : Adapto électrorétinogramme.

a) EN MEDECINE GENERALE :

Les anthocyanosides ont les indications des facteurs vitaminiques, à savoir :

- dans la fragilité et les troubles de la perméabilité capillaire :
 - hypertension
 - spasmes cérébraux, state
 - athérosclérose cérébrale
 - troubles hémorragiques des cirrhotiques
- dans les maladies des veines :
 - oedème vespéral
 - ulcères variqueux
 - insuffisance veineuse de la grossesse
 - hémorroïdes.

b) EN OPHTALMOLOGIE

Les anthocuanosides améliorent la vision nocturne (scotopique) et crépusculaire (mésopique).

Ils agissent au niveau même de la rétine en favorisant la régénérescence du pourpre rétinien.

En outre, ils agissent par leur activité vitaminique, ils renforcent la structure des capillaires, évitent, à leur niveau, la fuite des protéines et des éléments figurés du sang.

c) EN STOMATOLOGIE

Récemment Mademoiselle BONNET (30) étudie les effets pharmacologiques des anthocyanosides sur les lésions gingivales du lapin carencé en facteurs vitaminiques P et arrive à la conclusion suivante : ces anthocyanosides présentent une action anti-hémorragique notable et permettent une cicatrisation des tissus gingivaux lésés.

II - RAPPELS PHYSIOLOGIQUES SUR LA RETINE

La subdivision de la rétine en dix couches d'après les données histologiques a été également reconnue valable au point de vue métabolique (113) dès 1956 et les recherches de l'école de WALD (87) (149) et KINOSHUTA (99) étudiant le cycle de la rhodopsine ont clairement mis en évidence les inter-relations existant entre les cellules visuelles et plus particulièrement les segments externes et internes de l'épithélium pigmentaire (77).

On a particulièrement insisté sur la teneur de la rétine en glycogène mais celle-ci est surtout localisée dans les éléments gliaux et plus précisément dans la fibre de MÜLLER dont la charge varie suivant les espèces animales (80).

L'activité de la diaphorase est également intense dans cette fibre. Tandis que les uns observaient une augmentation de la quantité de glycogène, après adaptation à l'obscurité surtout dans la couche granuleuse interne et dans le plexiforme externe, les autres ne constataient aucune modification, tant après adaptation à l'obscurité, qu'après action de la lumière.

Mais les autres éléments structuraux semblent aussi intervenir activement dans les fonctions de la rétine ce qui a entraîné l'analyse histochimique de ces diverses couches (198) (172) en ce qui concerne les estérases (56) les mono-aminoxydases (155) les glucuromidases (169), les enzymes oxydatives (56) (142) (168) et la dephosphorylation (168).

On a pu montrer dès ces travaux qu'après adaptation à l'obscurité il se produisait une augmentation très sensible de l'A.D.H. dans l'épithélium pigmentaire (142).

Etudions maintenant les effets de la lumière sur la rétine :

La lumière provoque au niveau de la rétine une scission de la rhodopsine en optine et rétinène₁ trans. Ce dernier est réduit en vitamine A trans sous l'action de la rétinène réductase, dont le coenzyme est le NAD et qui est probablement identique à l'alcool deshydrogénase.

On ne connaît que peu de choses sur le mécanisme par lequel la photolyse de la rhodopsine conduit à une excita-

tion nerveuse; HECHT, SHLAER et PIRENNE (83) ont montré que les bâtonnets rétinien pouvaient être stimulés par l'absorption d'un quantum de lumière. Par quel mécanisme "amplificateur" un quantum réagissant avec une simple molécule de rhodopsine peut-il provoquer une stimulation nerveuse ? Trois hypothèses sont proposées : l'hypothèse enzymatique, l'hypothèse de l'état solide, l'hypothèse ionique.

A) L'hypothèse enzymatique admet que la rhodopsine est une proenzyme, qui sous l'influence de l'absorption de lumière, est transformée en une enzyme activée. Cette enzyme activée catalyse alors un processus électrochimique conduisant à l'excitation d'une cellule bipolaire. Plus récemment WALD (192) suggéra que le processus visuel pourrait être du à une cascade proenzyme-enzyme comme c'est le cas dans la coagulation sanguine. Aucune confirmation expérimentale ne fut faite.

De plus, SEEGER (166) signale que la coagulation sanguine est un phénomène autocatalytique irréversible plutôt qu'amplificateur.

Ce type de processus est sans doute trop lent pour expliquer la stimulation visuelle. CONNELL & SCARPELLI suggérèrent que la rhodopsine pourrait être une ATP ase activée par la lumière et ayant le rétinène comme co-facteur. Cependant, une étude faite dans le laboratoire de BONTING (31) (32) prouve que cette hypothèse n'est pas valable et que ni l'ATP ase activée par le Mg ni l'ATP ase activée par Na-K-Mg dans les segments externes des bâtonnets ne peut être identifiée à la rhodopsine. Des résultats négatifs eux aussi sont rapportés par FRANK & GOLDSMITH (68).

B) L'hypothèse de l'état solide est basée sur la structure quasi cristalline du segment externe du bâtonnet rétinien. Elle suppose qu'un processus, dû à cet état solide, comme un transfert d'énergie par résonance ou photoconduction, pourrait suivre l'absorption de lumière. Cependant HAGINS et JENNINGS (79) ne parviennent pas à mettre en évidence le rôle du transfert d'énergie par résonance dans l'excitation visuelle de bâtonnets de grenouille. En outre, LIEBMAN (109) établit qu'une illumination localisée par un micro-rayon de 3 Mm de diamètre ne provoquait pas de blanchissement à une distance de 2 mm du point d'illumination.

D'autres considérations théoriques semblent plaider contre ce mécanisme conduisant à une excitation visuelle : la concentration relativement basse de la rhodopsine dans les bâtonnets de bétail, la similitude du devenir du β carotène et celui de la rhodopsine (160) ce qui rendrait le cycle de la rhodopsine superflu.

C) L'hypothèse ionique eut des adeptes quand les travaux de HAGINS (79) ont établi que les bâtonnets de rétine avaient une composition semblable à celle de cellules nerveuses (1) HAGINS, ZONANA et ADAMS (80) confirmèrent ensuite que la lumière provoquait sur les photorécepteurs un influx de courant sur une distance de 7 Mm du lieu d'absorption lumineuse. Des expériences montrèrent ensuite (78) que ce courant consistait en un influx d'ions Na dans le segment externe, ceci dû à une augmentation locale de la perméabilité au Na sous l'influence de la lumière et à un reflux du reste de la cellule des ions K

Si cette découverte peut être généralisée aux autres espèces animales, on peut conclure qu'il y aurait un mouvement d'ions à travers la membrane photoréceptrice à la suite d'une excitation visuelle, comme cela se passe dans les cellules nerveuses après excitation.

La présence d'une forte concentration en ATP ase activée par le Na et K dans le segment externe des bâtonnets confirme cette hypothèse (31) car ce système enzymatique joue un rôle important dans la repolarisation.

Cette enzyme serait capable de restaurer les gradients ioniques dans les cellules réceptrices et ceci par une sortie active de Na et une pénétration de K.

Cette hypothèse nous a amené à étudier de façon plus particulière les variations de l'ATP ase en fonction de l'éclairement.

Chapitre II

RECHERCHES EXPERIMENTALES

GENERALITES

MOYENS D'ETUDES : Expression des résultats

I - MOYENS D'ETUDES

L'interaction des anthocyanosides sur chaque activité enzymatique a été étudiée *in vitro* sur la rétine de porc et *in vivo* sur celle de lapin.

A) *In vitro* : Prélèvement

Les yeux sont prélevés dès l'abattage des animaux et les rétines sont recueillies au plus tard dans l'heure qui suit

Préparation enzymatique

Nous opérons sur des lots de 8 à 10 rétines, qui, après avoir été pesés, sont additionnés en proportion convenable d'eau distillée refroidie. Un broyage à l'"Ultra-Turrax" permet d'obtenir une solution parfaitement homogène. Ces homogénats sont alors centrifugés et les surnageants constituent les préparations enzymatiques, qui seront diluées, en proportions variables selon les différentes techniques de dosage.

Les tubes "traités" recevront une quantité d'anthocyanosides déterminée que nous ajoutons au milieu réactionnel : tampon ou substrat suivant le dosage. Les solutions obtenues sont rendues homogènes par broyage à l'"Ultra-Turrax".

B) In vivo : *Témoins*

Les essais sont effectués sur des lapins "fauve de Bourgogne" soumis à un régime normal. Chaque activité enzymatique est déterminée sur 14 lapins soit 28 rétines. Les lapins sont tués par saignée, après l'ouverture de la carotide, les yeux sont immédiatement prélevés et nous procédons à la préparation des homogénats puis des dilutions.

Traités

Les lapins reçoivent deux doses de 100 mg par kg de poids corporel d'anthocyanosides dans la veine marginale de l'oreille. La première dose, 24 heures avant, puis la seconde, 1 heure avant le sacrifice. Nous procédons ensuite de la même façon que pour les lapins témoins.

II - EXPRESSION DES RESULTATS

Pour chaque activité enzymatique examinée, après avoir exposé le principe de la technique d'expérimentation, énuméré les réactifs nécessaires à la réalisation du dosage, précisé des détails du protocole opératoire, les résultats expérimentaux seront consignés dans un tableau indiquant :

- la nature et le taux de dilution de la préparation enzymatique,
- le temps d'incubation au bain-marie,
- la moyenne arithmétique M des résultats, exprimée en pourcentage du substrat métabolisé ou de substrat non métabolisé dans le cas de l' α hydrobutyrodeshydrogénase,
- au lieu de nous arrêter à l'écart standard pour chaque moyenne, caractérisant la dispersion des résultats établis selon la formule :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (M - Mx)^2}{n - 1}}$$

dans laquelle :

Σ = somme
 M = moyenne arithmétique des résultats
 Mx = résultat partiel
 n = nombre d'expériences

nous préférons calculer en plus, grâce à σ l'intervalle de confiance 95 p. 100 que nous appellerons α et qui est donné par la formule :

$$\alpha = t_{0,05}^{\delta = n-1} \times sm$$

$$\text{ou} \quad \delta = n - 1$$

$$sm = \frac{\sigma}{\sqrt{n - 1}}$$

t étant donné par les tables de student en prenant en ordonné la valeur de $\delta = n - 1$ et dans la colonne des abscisses, la valeur p = 0.05 (correspondant à 95 %)

Nous avons étudié les activités : lactate deshydrogénasique, α l'hydroxybutyrate deshydrogénasique, glucose 6 phosphate deshydrogénasique, α glycéro phosphate deshydrogénasique, phosphoglucomutasique, 5 nucléotidasique, phosphoglucose isomérasique. L'étude des variations de l'activité A.T. Pasique a été recherchée dans un but différent et dans des conditions expérimentales particulières.

ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE (L.D.H.)

(1 - 1 - 1 - 27)

THUNBERG (184) en 1920 découvre cet enzyme dans les tissus qui oxydent la lactate et dont l'activité dépend d'un cofacteur soluble dans l'eau. Plus récemment, des préparations d'enzyme cristallisée sont décrites à partir de coeur de bovins (174).

Le procédé qu'emploie STRAUB pour l'isolement de l'enzyme à l'état cristallisé, à partir du coeur de bovin, peut être utilisé pour le coeur de porc et correspond à une première étape pour la purification de l'enzyme à partir du muscle cardiaque humain (138).

De nombreuses preuves ont été accumulées pour l'existence de différentes formes de LDH. On utilise le terme d'isoenzymes pour caractériser les différentes formes moléculaires sous lesquelles les protéines, avec la même activité enzymatique peuvent exister (118) WIELAND & PFEIDERER démontrent les premiers que l'on peut séparer par électrophorèse les six composés de la LDH (196). Ce même auteur (195) démontra que la distribution quantitative des isozymes dans le même organe à partir de spécimens de la même espèce était constante et établit la distribution quantitative pour le coeur, rein, cerveau et foie du rat, lapin et de l'homme.

La lactate déshydrogénase ou lactico déshydrogénase catalyse la réaction :



étape primordiale de la dernière partie du catabolisme glucidique en anaérobiose.

La mesure de l'activité lactico-déshydrasique est d'une grande utilité dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde, des hépatites aiguës, des myopathies de certaines leucémies.

PRINCIPE

La technique utilisée est le procédé photocolorimétrique de CABAUD & WROBLEWSKI (34) selon le protocole modifié par BASTIDE, BAUDON, DASTUGUE, REBIERE (10). A pH 7,8 la lactico déshydrase transforme en présence de N.A.D.H₂ l'acide pyruvique en acide lactique et N.A.D. l'acide pyruvique non consommé réagit avec la 2-4-dinitrophénylhydrazine, pour former un hydrazone coloré, dosé en milieu sodique à 525 mμ. Les autres composés sont incolores.

REACTIFS

- *Solution tampon de phosphate pH 7,8 :*

solution A : phosphate monopotassique M/15 (9,078 g p. l)

solution B : phosphate disodique cristallisé à 12 H₂O
M/15 (23,870 g p. l)

Mélanger 85 ml de solution A et 915 ml de solution B et ajuster à pH 7,8 à l'aide d'une solution de NaOH N

- *Solution de pyruvate de sodium :* 0,001 M, dissous dans le tampon (à conserver à + 4° C une semaine au maximum).

- *Solution de diphospho-pyridine nucléotide réduit :*

N.A.D.H₂ à 10 %. Cette solution doit être préparée extemporanément dans de l'eau glacée à utiliser immédiatement, à cause de son extrême oxydabilité.

- *Solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine :* 2-4 dinitrophénylhydrazine 200 mg HCL concentré 85 ml, eau distillée, q.s.p. 1 litre. Conserver à + 4° C, en flacons colorés.

- *Solution de soude 0,4 N.*

MODE OPERATOIRE

Incuber au bain-marie à + 37° C, 1 ml de pyruvate de sodium 0.001 M en tampon phosphate de pH 7,8, 0,1 ml de N.A.D.H₂ à 10 p. 100 (solution extemporanée de N.A.D.H₂ dans l'eau distillée glacée) et 0,1 ml de préparation enzymatique.

Au terme de l'incubation (15 minutes ou 30 minutes), ajouter 1 ml de solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine (qui arrête la réaction et développe la coloration), sortir du bain-marie, agiter légèrement et laisser à la température du laboratoire pendant 20 minutes. Ajouter alors 10 ml de NaOH 0,4 N et agiter par renversement. Effectuer la lecture au photocolorimètre à 525 mμ.

La courbe d'étalonnage est obtenue en utilisant des quantités connues et croissantes de solution tamponnée de pyruvate de sodium 0,001 M; répartir dans 11 tubes, 0 ml - 0,1 ml - 0,2 ml - etc ... de pyruvate 1,2 ml - 1,1 ml - etc ... d'eau distillée; ajouter alors 1 ml de 2-4 dinitrophénylhydrazine et continuer ainsi qu'il est décrit ci-dessus. Le témoin servant à régler l'appareil est constitué de 1 ml de pyruvate et de 0,2 ml d'eau distillée. Il est, de plus, à noter que nous n'avons pas constaté de réduction spontanée de pyruvate en lactate.

RESULTATS

Les résultats concernant l'activité lactate déshydrogénasique au niveau de la rétine de porc en présence d'anthocyanosides, figurent au tableau I.

Une activité un peu inférieure avait été décelée dans les rétines de bovidés (surnageants d'homogénats au 1/1000 : 25 à 30 p. cent d'activité après 30 minutes d'incubation (13)). De plus, on remarque une activation nette de l'activité lactico déshydrogénasique en présence d'anthocyanosides in vitro.

Cette même activation est retrouvée in vivo chez le lapin. L'activité lactate déshydrogénasique a été déterminée par de nombreux auteurs.

Certains se sont attachés surtout à une localisation histochimique de cette enzyme dans les différents tissus rétinien. LOWRY 1954 (112) détecte dans la rétine de singe Rhésus, des activités lactate déshydrogénasique et malico déshydrogénasique et constate une distribution identique de ces deux enzymes. Ce même auteur, localise l'activité déshydrogénasique aux couches réticulaires externes chez le singe Rhésus et à toutes les couches internes chez le lapin, les segments externes des cônes et des bâtonnets étant très pauvres en cette enzyme

COCAN 1959 (41) confirme cette localisation de la L.D.H. et conclut à un maximum d'activité L.D.H. dans les fibres de müller, les cellules gliales et les cellules ganglionnaires. Plus tard, NASU 1962 (134) attribuera l'activité des enzymes oxydatives, dont la L.D.H., aux cellules des cônes plus qu'aux cellules des bâtonnets cela dû, sans doute, à leurs fonctions photophysologiques.

MISUKO 1964 (127) expérimente sur des rétines de singes, chats et lapins et trouve une activité L.D.H. remarquable dans les cellules gliales par rapport aux cellules nerveuses.

UYEDA 1966 (189) étudie la L.D.H. sur différents tissus oculaires du lapin et détermine quantitativement les activités L.D.H. de la rétine au spectrophotomètre suivant la méthode de Bergmeyer dans la rétine. Certains auteurs ont séparé 5 isozymes de la L.D.H. dans la rétine par électrophorèse parmi ceux-ci MATSUDA 1967 (119), GRAYMORE 1964 (74).

D'autres auteurs se sont intéressés à l'activité lactate-déshydrogénasique de la rétine pour étudier le métabolisme rétinien. Parmi ceux-ci EUTTERMAN 1959 (57) expérimentant sur des homogénats de rétine de bétail, étudiant la consommation d' O_2 en présence de différents substrats, arrive à la conclusion suivante : la rétine utilise le glucose par glycolyse et par le cycle citrique. EVERSOW 1960 (58) restreint ce catabolisme du glucose par la rétine, à une glycolyse, le cycle citrique, pour lui, joue un rôle subsidiaire, le métabolisme des acides gras n'en joue pratiquement aucun.

LEVENE 1964 (108) sur des rétines de rat, chat, chien arrive à la même conclusion.

Enfin, certains auteurs, ont étudié les variations physiologiques ou pathologiques de cette enzyme.

Une augmentation de l'activité L.D.H. au cours de la croissance et donc de la différenciation histophysiologique de la rétine de rats est observée par GRAYMORE 1963 (75) et par BONAVIDA 1963 (28) (29) qui, lui, précise que cette activité L.D.H. diminue progressivement chez les rats atteints de dystrophies congénitales.

Cette déficience lactate déshydrogénasique a aussi été rapportée par PFERSCH 1963 (145) chez la souris après dégénérescence des cellules photoréceptrices et par SCHIMKE 1954 (164) chez des lapins maintenus à l'obscurité totale depuis leur naissance.

Dans le cadre des variations pathologiques de la L.D.H., citons les travaux de RICHTER 1964 (157) et ceux de WITTMER 1967 (199). Ces deux auteurs arrivent à la même conclusion : l'activité lactate déshydrogénasique augmente au niveau des liquides sous-rétiniens dans le cas de détachement de la rétine.

Par contre, chez le rat, cette activité, d'après les travaux de NEWELL 1963 (135) ne serait pas affectée par le diabète alloxanique. Enfin, de nombreux auteurs, ont étudié les variations de cette activité lactate déshydrogénasique après injection ou ingestion de substances variées.

In vitro, CENTANNI 1955 (38) montre l'action activatrice de la cortisone sur l'activité lactate déshydrogénasique de la rétine.

In vivo, BERARDINIS 1953 (22) après injection intra-veineuse d'iodacétate de sodium sur le lapin, remarque une diminution considérable de la glycolyse rétinienne au bout de 30 jours. Au contraire, 5 à 8 minutes après injection intra-veineuse de mono-iodacétate de sodium, d'après FORGACS 1963 (67) et VECCHIOWE 1962 (190) les activités déshydrogénasiques seraient inchangées.

MEIER-RUGE 1966 (123) provoque en 4 à 6 semaines chez le chat et avec des doses subtoxiques de pipéridylchlorophénothiazine une rétinopathie pigmentaire et note que la désagrégation des segments distaux des bâtonnets est précédée histochimiquement par une réduction de l'ATP ase et une inhibition de la lactate déshydrogénase.

Très récemment WEGMAN, TRONCHE & BASTIDE 1968 (194) étudiant les effets des anthocyanosides sur les adaptarétino électrogrammes et les activités enzymologiques conclurent que ces substances ont un effet spécifique qui résiderait dans la stimulation immédiate de la L.D.H. Sans pouvoir démontrer une augmentation totale des pigments visuels, on pourrait admettre d'après ces auteurs, que l'intensité des réactions concourant à sa formation est très notablement stimulée par les anthocyanosides.

Tableau I

ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE : L.D.H.

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de porc après addition in vitro d'anthocyanosides

HOMOGENATS AU				1/250		1/500		1/1000	
				M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (minutes)	15 MINUTES	ANTHOCYANOSIDES (mg par essai)	0,0	34,1	10,0	13,8	7,6	9,0	3,0
			0,5	53,2	18,8	25,0	7,6	18,4	7,6
			1,0	55,0	6,7	27,6	7,8	20,1	7,0
	30 MINUTES		0,0	52,1	15,1	20,0	7,1	12,3	6,2
			0,5	70,0	13,3	35,0	8,4	19,4	9,2
			1,0	71,4	12,2	38,0	7,2	19,0	11,6

Tableau II

ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE : L.D.H.

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de lapin après deux injections intra-veineuses d'anthocyanosides (100 mg par kg) à 24 heures d'intervalle.

HOMOGENATS AU			1/500		1/1000		1/2000	
			M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	15 Minutes	Témoins	28, 0	4, 3	17, 1	3, 1	10, 1	3, 1
		Traités	34, 1	6, 3	19, 4	3, 7	11, 2	4, 0
	30 Minutes	Témoins	43, 2	3, 9	27, 0	5, 7	15, 1	3, 7
		Traités	53, 4	4, 7	29, 2	3, 5	19, 3	4, 5

ACTIVITE α -HYDROXYBUTYRATE DESHYDROGENASIQUE (α H. B. D. H.)

(1 - 1 - 1 - 30)

L'hydroxybutyrate déshydrogénase (H.B.D.H.) catalyse réversiblement la transformation d' α -cétobutyrate en α -hydroxybutyrate selon le schéma :



Les variations de cette activité enzymatique ont été particulièrement observées par Pagliaro et Notarbartolo qui notent les élévations de son taux sérique dans l'infarctus, la myopathie et la néphrose. La technique utilisée est une adaptation de celle décrite par Rosalki.

PRINCIPE

L' α -cétobutyrate est réduit par l'H.B.D.H. en présence de N.A.D.H₂ en α -hydroxybutyrate. La réaction est stoppée par la 2-4 dinitrophénylhydrazine qui réagit avec l' α -cétobutyrate restant pour former l'hydrozone α -cétobutyrique; celle-ci se colore en jaune brun en milieu alcalin, on examine la coloration à 490 m μ .

REACTIFS

- Solution tampon de phosphates M/15 de pH 7,4 selon Sorensen:
Mélanger 80,2 ml de solution de PO₄Na₂H, 12 H₂O à 23,878 g p. 1 avec 19,8 ml de solution de PO₄H₂K à 9,08 g p. 1.

- *Solution mère d' α -cétobutyrate 0,1 M (P.M. = 102)*
Peser 1,02 g d'acide α -cétobutyrique, ajouter 30 ml de tampon, ajuster le pH à 7,4 (par sol. saturée de KOH à verser goutte à goutte) et compléter avec le tampon q.s.p. 100 ml. Se conserve à - 25° C (plusieurs mois).
- *Solution diluée de substrat* : Diluer la solution mère au 1/100, dans le tampon phosphate : mettre en fioles de 20 ml. Demeure stable 1 mois à - 25° C.
- *Solution de N.A.D.H₂* : Solution extemporanée à 10 mg par ml de N.A.D.H₂ sodique à conserver dans un bain de glace durant l'expérience.
- *Solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine (D.N.P.H.)* : Peser 400 mg de 2-4 D.N.P.H., ajouter 85 ml d'HCl concentré et eau q.s.p. 1 litre. Se conserve plusieurs semaines à +2° C.
- *NaOH 0,4 N* : Solution aqueuse de NaOH à 16 g p. l.

MODE OPERATOIRE

Incubation

Préparer une série d'essais contenant respectivement : 1 ml de substrat 0,1 ml de préparation enzymatique, 0,1 ml de solution de N.A.D.H₂ et les porter au bain-marie maintenu à + 37° C à l'aide d'un thermostat "Thermomix". Utiliser des témoins sans solution enzymatique. En fin d'incubation, ajouter 1 ml de solution de 2-4 D.N.P.H., agiter et laisser reposer 20 minutes, à la température du laboratoire. Ajouter ensuite 10 ml de NaOH 0,4 N, agiter, laisser reposer 10 minutes. Apprécier la coloration obtenue au photocolorimètre à 490 m μ .

Etalonnage

Il est réalisé à l'aide de la solution diluée de substrat dont les volumes de 1,0 - 0,9 - 0,8 .. 0,1 - 0 ml additionnés de 0,2 - 0,3 - 0,4 .. 1,1 - 1,2 ml de solution tampon sont traités comme le milieu réactionnel des essais en fin d'incubation. Ces solutions correspondront respectivement à 0 - 10 ... 90 - 100 % d'activité enzymatique.

RESULTATS

Les résultats concernant l'activité α hydroxybutyrate déshydrogénasique au niveau de la rétine de porc en présence ou absence d'anthocyanosides figurent au tableau III.

Ceux concernant la même activité au niveau de la rétine de lapin in vivo sont consignés dans le tableau IV.

Nous avons trouvé que l'activité α hydroxybutyrate déshydrogénasique, tout comme l'activité lactate déshydrogénasique, était augmentée en présence d'anthocyanosides, tant in vitro qu'in vivo.

Nous pouvons signaler que cette activité enzymatique ne paraît pas avoir été étudiée dans les milieux oculaires si ce n'est par les travaux effectués dans le laboratoire de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand par BASTIDE, SOULA, TRONCHE, DASTUGUE (15) qui décèlent au niveau de la rétine de bovidés une activité α -hydroxybutyrate-déshydrogénasique encore plus élevée que chez le porc (homogénat de rétine au 1/100 51% de substrat métabolisé après 30 minutes d'incubation) alors qu'ils constatent son absence au niveau des humeurs aqueuse et vitrée

Citons aussi dans le même Laboratoire, les travaux de Mademoiselle JONADET (92) sur l'activité α -hydroxybutyrate-déshydrogénasique de la cornée de bovidés, qui est bien inférieure à celle de la rétine (homogénat au 1/100 : 10,9 % de substrat métabolisé après 30 minutes d'incubation).

Tableau III

ACTIVITE α HYDROXYBUTYRATE DESHYDROGENASIQUE : α -H. B. D. H.

Pourcentages de substrat non métabolisé par les homogénats de rétines de porc après addition, *in vitro*, d'anthocyanosides.

HOMOGENATS AU				1/100		1/200		1/500	
				M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	30 MINUTES	ANTHOCYANOSIDES (mg par essai)	0,0	55,4	12,5	30,0	10,2	8,0	5,5
			0,5	58,5	15,6	35,9	11,2	9,9	4,3
			1,0	62,4	13,4	39,2	12,4	16,0	11,2
	60 MINUTES		0,0	72,3	9,0	45,3	14,8	17,0	8,0
			0,5	74,2	13,2	46,4	13,5	19,1	4,0
			1,0	77,1	11,6	49,1	15,2	26,2	9,2

Tableau IV

ACTIVITE α HYDROXYBUTYRATE DESHYDROGENASIQUE

Pourcentages de substrat non métabolisé par les homogénats de rétines de lapin après deux injections intra-veineuses d'anthocyanosides (100 mg par kg) à 24 heures d'intervalle.

HOMOGENATS AU			1/200		1/400	
			M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	15 MINUTES	Témoins	21,1	2,8	7,1	2,1
		Traités	27,3	4,6	13,3	2,3
	30 MINUTES	Témoins	47,2	3,8	17,5	2,2
		Traités	48,9	5,6	27,9	2,1

ACTIVITE 6 PHOSPHO GLUCONATE DESHYDROGENASIQUE (6-P.G.D.H.)

(1 - 1 - 1 - 43)

WARBURG et collaborateurs ont découvert que l'oxydation du glucose 6 phosphate est suivie par le stade acide-6-phosphogluconique dans les extraits de levure. Ensemble, CHRISTIAN et WARBURG (193) et DICKENS (54) démontrent que la dégradation de l'acide 6 phosphogluconique consistait en une décarboxylation oxydative conduisant sans doute à un pentose phosphorylé. Quelques temps auparavant LIPMANN (110) proposait le D-Arabinose 5-phosphate comme produit d'oxydation de l'acide-6-phosphogluconique. Le problème en resta là, plus de dix ans, lorsque HORECKER et SMYRNIOTIS (85) (86) prouvèrent que la déshydrogénation initiale s'effectuait suivant la réaction conduisant au ribulose 5 phosphate comme produit de l'oxydation de l'acide 6-phosphogluconique.



Mais la présence de phosphoribose isomérase dans les préparations de 6-phosphogluconate déshydrogénase très partiellement purifiées, rapidement conduisit à établir un équilibre entre ribose 5-phosphate et ribulose 5-phosphate (42) en faveur de l'aldopentose phosphate.

La preuve définitive de la validité de la réaction fut donnée en 1961 par HORECKER et coll. qui isolèrent une préparation cristallisée de 6-phosphogluconate déshydrogénase débarrassée de phosphoribose isomérase, et purent ainsi établir que le cétopentose était le produit de la réaction catalysée par la 6-phosphogluconate déshydrogénase.

La 6-phosphogluconate déshydrogénase ou 6 PGdh est dosée selon la technique de KING.

PRINCIPE

La formation de NADPH_2 est suivie à 340 m μ



REACTIFS

- *Solution tampon barbital 0,1 M pH 8,6* : Mélanger 87,1 ml de solution de barbital de Na à 20,62 g. p. 1000 à 12,9 ml de HCl 0,1 N (HCl concentré, dilué au 1/100). Vérifier le pH.
- *Solution de substrat (6 PG sodique; 2 H₂O PM 378) 0,02 M*
Dissoudre 7,6 mg par ml d'eau distillée de 6-phosphogluconate trisodique (extemporané ou congelé).
- *Solution de Mg Cl₂ 0,2 M* : Dissoudre 4,066 g de Mg Cl₂ 6 H₂O dans 100 ml d'eau distillée.
- *Solution de cystéine 0,1 M* : Dans la soude 0,1 N, dissoudre 16 mg de chlorhydrate de cystéine par ml de soude 0,1 N
- *Solution Na DPNa 2 H₂O* : 2 mg p. ml extemporané ou congelé.
- *Solution de Na DPH₂* : Na₄ 2 H₂O 0,217 mg/ml dans le mélange tampon dilué au demi.

TECHNIQUE

Dans la cuve du spectrophotomètre, mélanger 1,2 ml de tampon, 0,2 ml de solution de Mg Cl₂, 0,2 ml de solution de cystéine, 0,2 ml de solution de NADP, 22, 1,0 ml d'enzyme. Ajouter 0,3 ml de substrat. Lire alors la D.O. à 340 m μ toutes les minutes pendant 10 minutes.

ETALONNAGE

Faire une gamme avec 0,2 ml de tampon, 0,2 ml de $Mg\ Cl_2$, 0,2 ml de cystéine, 0,3 ml de substrat et 0 à 2 ml de $NaDPH_2$ en solution dans le mélange tampon dilué au demi

RESULTATS

Nous rapportons dans le tableau V les résultats relatifs à l'activité 6-phosphogluconate déshydrogénasique au niveau de la rétine de lapin avec ou sans injection d'anthocyanosides.

Cette activité est stimulée en présence d'anthocyanosides (+ 15 %).

DISCUSSION

La 6 PGDH a été trouvée dans le rein chez la grenouille KARNOVSKY et HIMMELHOCH trouvent une activité, élevée de 6 PGDH dans le tube proximal du néphron, et basse dans le tube distal. Citons encore les travaux de GLOCK et Mc LEAN (72), NEWBURG et CHELDELIN sur le rat et le lapin, de HESS et PEARSE sur le rat.

Dans les milieux oculaires, la 6 phosphogluconate déshydrogénase a été décelée dans les rétines de bovidés par DE BERARDINIS (22). D'après HEATH (82) elle ne varie pas dans la rétine du rat soumis à un diabète alloxanique.

CALABRIA (36) étudiant le métabolisme des carbohydrates de la rétine de veaux et lapins recherche l'activité 6-phosphogluconate déshydrogénasique et signale sa présence sur les différentes couches de la rétine.

LOWRY (115) étudiant la répartition histologique de certaines enzymes du métabolisme du glucose au niveau de la rétine conclut que la 6-phosphogluconate déshydrogénase est surtout localisée dans le premier neurone

Tableau V

ACTIVITE 6 PHOSPHOGLUCONATE DESHYDROGENASIQUE

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de lapin après deux injections intra-veineuses d'anthocyanosides (100 mg par kg) à 24 heures d'intervalle (28 rétines).

HOMOGENATS AU			1/250		1/500		1/1000	
			M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	1	Témoins	15,5	2,3	7,8	1,1	4,5	0,8
		Traités	19,0	1,8	9,0	0,8	5,0	0,8
	5	Témoins	27,0	3,0	13,6	3,0	6,4	1,4
		Traités	32,1	1,6	16,3	0,8	8,1	0,8
	10	Témoins	35,9	4,1	19,3	3,4	8,7	1,8
		Traités	41,0	1,4	21,3	1,1	11,0	2,3

ACTIVITE GLUCOSE 6 PHOSPHATE DESHYDROGENASIQUE (G₆PDH)

(1 - 1 - 1 - 49)

Cette enzyme débute le cycle des pentoses, par déshydrogénation du glucose-6-phosphate en 6 phosphogluconolactone suivant le schéma :



La découverte de ce système enzymatique découle de l'observation de BARROW qui démontre que le glucose est oxydé par les globules rouges en présence de bleu de méthylène ou de méthémoglobine. WARBURG et CHRISTIAN démontrent ensuite qu'un extrait soluble de globules rouges oxyde non plus le glucose, mais l'ester glucose 6 phosphorique ou ester de Robison. Ces travaux sont très importants "ils sont à l'origine de la découverte du NADP, des ferments jaunes et du rôle des coenzymes".

DOSAGE

Principe

Il existe de nombreuses méthodes de dosage : méthodes colorimétriques employant le dicloroindolphérior, le bleu crésyl brillant ou le dichloroindophénol et méthosulfate de phénazine.

Nous avons utilisé une méthode spectrophotométrique : celle de KORNBERG et HORECKER légèrement modifiée (95). Cette

méthode mesure le taux de formation du TPNA d'après la réaction :



Le $NADPH_2$ formé est mesuré au spectrophotomètre, il provoque une augmentation d'absorption à 340 m μ .

REACTIFS

- G_6P 2,05. 10^{-2} M : Dissoudre 535,05 mg de G_6P Ba 7 H_2O dans 25 ml de $CH_3 COOH$ 0,5 (soit une solution à 28,5 ml d'acide acétique pur RP par litre d'eau).
Ajouter une solution de $SO_4 K_2$ 0,57 M (soit une solution aqueuse de $SO_4 K_2$ à 99,18 g p. 1), jusqu'à précipitation totale (environ 2 ml). Eliminer le précipité de sulfate de baruym par centrifugation; neutraliser goutte à goutte le surnageant par KOH N (solution aqueuse de KOH à 28 g p. 1). Diluer à 42,5 ml (il y a environ 15 p 100 de l'ester absorbé par le précipité de sulfate de baruym). Conserver à - 30° C en flacon de polythène.
- *Tampon chlorate de triéthanolamine* 5.10^{-2} M et EDTA Na_2 5.10^{-3} M de pH 7,6 : Mélanger 9,285 g de chlorate de triéthénolamine (PM : 185,7) à 1,861 g d'EDTA Na_2 (PM : 372,25), eau q.s.p. dissoudre, ajuster à pH 7,6 avec KOH N (environ 1,1 ml) et eau q.s.p. 1 litre.
- *Solution de NADP* 10^{-2} M : NADP $Na_2 H_2O$ (PM : 801,45) solution extemporanée à 8,0145 mg par ml, à conserver dans un bain de glace avant son utilisation.
- *Solution aqueuse de digitonine* à 0,02 p. 100
- *Solution aqueuse de chlorure de sodium* à 9 p. 1000
- *Solution de NADPH₂* 10^{-3} M : solution aqueuse extemporée de $NADPH_2 Na_4 2 H_2O$ (PM : 869,42) à 0,869 mg par ml de tampon.

MODE OPERATOIRE

Dans la cuve du spectrophotomètre, à 20° C, mettre 1,80 ml de tampon pH 7,6, 1,00 ml d'homogénat, 0,10 ml de TPN, 0,10 ml de G_6P

Lire l'absorption à 340 m μ , chaque minute, durant 10 minutes.

ETALONNAGE

Il est réalisé avec la solution de $NADPH_2$ dont on met de 0,1 ml de solution de G_6P et q.s.p. 3 ml de tampon, ce qui correspond de 0 à 100 p. 100 d'activité enzymatique.

RESULTATS

Les résultats relatifs à l'activité glucose 6 phosphate déshydrogénasique de la rétine de lapin, avec ou sans injection d'anthocyanosides sont donnés dans le tableau VI. La glucose 6 phosphate déshydrogénase n'est pas modifiée par les anthocyanosides.

DISCUSSION

La glucose 6 phosphate déshydrogénase a une répartition assez large. La distribution quantitative dans les tissus animaux a été rapportée de même que sa localisation dans le tissu nerveux (34) la médulo surrénale (76) (92). Cette enzyme a pu être isolée des globules rouges, des érythrocytes et de la levure ainsi que de certaines bactéries; de même l'enzyme de la glande mammaire en lactation a pu être cristallisée (48).

Au niveau de l'oeil, la glucose 6 phosphate déshydrogénase a été étudiée dans la rétine de lapin élevé à l'obscurité totale depuis la naissance, selon SCHIMKE (164) cette activité serait augmentée.

La présence de cette enzyme dans la rétine de souris, rat, cobaye, lapin et bovidés a été signalée par de nombreux auteurs : KUWABARA et COGAN (101), NIEMI et MERENNIES (136), LOWRY et coll. (115), HEATH et coll. (78), CALABRIA et ORZALESI (36), BASTIDE, TRONCHE et coll. (15).

Tableau VI

ACTIVITE GLUCOSE 6 PHOSPHATE DESHYDROGENASIQUE

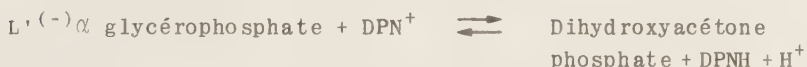
Fourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de lapin après deux injections intra-veineuses d'anthocyanosides (100 mg par kg) à 24 heures d'intervalle.

HOMOGENATS AU			1/250		1/500		1/1000	
			M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	1	Témoins	6,0	2,1	2,0	0,8	1,0	0,8
		Traités	4,0	1,1	3,0	0,8	1,0	0,8
	5	Témoins	16,0	1,4	8,0	1,4	4,0	1,6
		Traités	16,0	1,3	10,0	1,1	5,0	1,4
	10	Témoins	28,0	3,0	14,0	1,4	8,0	1,8
		Traités	28,0	2,7	16,0	0,8	9,0	0,8

ACTIVITE α GLYCEROPHOSPHATE DESHYDROGENASIQUE (α GPOH)

(1 - 1 - 99 - 5)

L' α glycérophosphate déshydrogénase est une enzyme soluble liée au DPN catalysant la transformation réversible de l' α glycérophosphate en dihydroxyacétone phosphate selon la réaction :



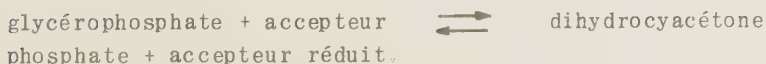
Elle a été découverte dans le muscle de rat par VON-EULER et coll. (1937). L'enzyme a été isolée et cristallisée pour la première fois à partir du muscle de rat par BARANOWSKI (1949).

Des études sur la distribution de l'enzyme dans les cellules et les tissus sont faites grâce à un dosage spectrophotométrique. Cette méthode de dosage a subi par la suite de nombreuses modifications en particulier par BEISENITERZ (18) (19), DEL BRUCK (52), YOUNG (200).

La méthode de dosage utilisée ici est celle de NACHLAS (133).

PRINCIPE

Le dosage est basé sur la réaction :



La phénazine méthosulfate sert de transporteur d'électrons pour les sels de tétrazolium. Le formazan formé par réduction de ces sels se prête à un dosage colorimétrique.

REACTIFS

- *Solution d' α glycérophosphate disodique* - PM : 324,13
Dissoudre 4,86 g dans 100 ml de tampon phosphate à pH 7,5.
- *Tampon phosphate pH 7,5*
Mélanger 17 ml de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ à 9,078 g pour 1 litre et 83 ml de PO_4HNa_2 à 23,870 g pour 1 litre Vérifier le pH
- *Solution d'INT*
Dissoudre dans le tampon phosphate 4 mg par ml d'INT ou 2 p p. iodophényl-3 p. nitrophényl 5 phényl tétrazolium chloride .
- *Solution de PMS (Phénazine méthosulfate)*
Faire une solution de 2,5 mg de PMS par ml de tampon phosphate; la conserver à 5° C à l'abri de la lumière (envelopper le flacon).
- *Solution de NAD* : PM = 735,5 soit 0,3675 mg par ml de tampon.
- *Solution d'acide trichloracétique à 10%*
- *Alcool éthylique à 95%*
- *Solution de NADH_2 pour l'étalonnage* à 3,9050 mg pour 1 ml de tampon.
- *Préparation enzymatique* : homogénat dans le tampon phosphaté pH 7,5.

TECHNIQUE

Pour chaque essai, mélanger :

- 0,2 ml de sol. d' α glycérophosphate

- 0,2 ml de sol. de NAD
- 0,2 ml d'enzyme
- 0,2 ml de sol. d'INT
- 0,2 ml de sol. de PS

Agiter. Incuber 15 minutes et minutes à 37°. Stopper la réaction en ajoutant 0,2 ml de solution d'acide trichloracétique à 10 %. 10 ml d'alcool à 95°. Agiter fortement puis centrifuger. Prélever 5 ml et passer au colorimètre à 490 m μ .

ETALONNAGE

Préparer une gamme avec :

- 0,2 ml de solution d' α glycérophosphate
- 0,2 ml de solution de NADH₂
- Sol. d'INT : 0 - 0,05 - 0,1 - 0,15 - 0,20
- tampon : 0,4 - 0,35 - 0,30 - 0,25 - 0,20
- 0,2 ml de solution de PMS

Agiter. Maintenir 15 minutes à 37° C à l'obscurité. Ajouter 10 ml d'éthanol absolu. Agiter fortement puis centrifuger. Prélever 5 ml et passer au spectrophotomètre. Lire à 490 m μ .

RESULTATS

Les résultats relatifs à l'activité α glycérophosphate déshydrogénasique sont donnés par les tableaux VII pour les expériences effectuées in vitro et VIII pour les expériences effectuées in vivo.

D'après ces tableaux, nous pouvons voir que l'activité α glycérophosphate déshydrogénasique est stimulée de façon nette par les anthocyanosides et ceci tant in vitro qu'in vivo puisqu'in vitro l'activité d'un homogénat au 1/5 après incubation de 30 minutes est de 52,3 alors que, après addition d'anthocyanosides dans le milieu réactionnel, cette activité est de 64. In vivo, l'activité d'un homogénat au 1/5,

après incubation de 30 minutes est de 29 chez le lapin témoin alors que, après injection d'anthocyanosides, un homogénat à la même concentration et après le même temps d'incubation est de 35,1

DISCUSSION

Dans les Laboratoires de Bücher, les concentrations en α glycérophosphate déshydrogénase ont été étudiées en détail sur les organes de rat après tumeur expérimentale par DELBRUCK (51). Cette activité enzymatique tant chez le rat que chez l'homme a été recherchée sur le foie par NIKKILA, SCHMIDT, KALK (137) (165) (93) sur le rein par LOHB (111) sur les leucocytes et autres composants morphologiques du sang par BOXER.

Des activités relativement fortes d' α glycérophosphate sont trouvées dans le foie, rein, muscle cardiaque chez le boeuf. L'activité des muscles lisses est seulement le 1/100 de celle du muscle strié. Le cerveau a également une activité mais dans cet organe, l'activité est faible.

Au niveau de l'oeil, cette enzyme a été étudiée par GRAYMORE (75) celui-ci travaillant sur des rétines de rats trouve une très faible activité d' α glycérophosphate déshydrogénase qui augmente avec le développement.

BAUM (16), MORONE (128) par des méthodes histochimiques, mettent en évidence chez le lapin et le rat la présence d' α glycérophosphate déshydrogénase au niveau de l'épithélium et de l'endothélium cornéen et de l'épithélium conjonctival; une réaction positive est également décelée au niveau des kératocytes du stroma cornéen.

Tableau VII

ACTIVITE α GLYCEROPHOSPHATE DESHYDROGENASIQUE

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de porc après addition in vitro d'anthocyanosides (80 rétines)

HOMOGENATS AU				1/5		1/10		1/20	
				M	α	M	α	M	α
TEMPS D' INCUBATION (Minutes)	15 MINUTES	ANTHOCYANOSIDES (mg par essai)	0, 0	33, 1	7, 8	20, 0	4, 8	11, 1	2, 6
			0, 1	34, 2	12, 6	21, 2	5, 5	12, 4	3, 8
			0, 5	37, 0	15, 1	23, 4	5,	13, 9	2, 9
	30 MINUTES		0, 0	52, 3	14, 0	30, 0	6, 0	16, 2	2, 0
			0, 1	56, 9	12, 6	32, 9	5, 3	18, 1	2, 8
			0, 5	64, 0	6, 8	33, 1	5, 4	19, 8	2, 9

Tableau VIII

ACTIVITE α GLYCEROPHOSPHATE DESHYDROGENASIQUE

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de lapin après deux injections intra-veineuses d'anthocyanosides (100 mg par kg) à 24 heures d'intervalle (28 rétines)

HOMOGENATS AU			1/10		1/20		1/40	
			M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	15 MINUTES	Témoins	23, 3	5, 0	16, 1	4, 2	9, 8	2, 5
		Traités	28, 0	4, 8	19, 0	3, 9	13, 2	2, 5
	30 MINUTES	Témoins	29, 0	6, 1	20, 2	3, 5	13, 3	2, 1
		Traités	35, 1	7, 9	24, 1	5, 6	17, 1	5, 0

ACTIVITE PHOSPHOGLUCOMUTASIQUE (PGM)

(2 - 7 - 5 - 1)

La présence d'une enzyme dans les tissus qui convertit le glucose 1 phosphate en glucose 6 phosphate fut établi lors des études de la rupture du glycogène dans le muscle

L'on trouva que dans des préparations très minces de muscle lavé la rupture du glycogène résulte d'une accumulation d'un ester de phosphate jusqu'alors inconnu, le glucose 1 phosphate par addition de G_6P qui lui était connu.

Cette découverte fut rapidement suivie par l'isolement et la synthèse chimique du nouveau composé (C 43) et la caractérisation de l'enzyme responsable de cette transformation en G_6P (44) (45).

La phosphoglucomutase catalyse la réaction :



PRINCIPE

Le phosphate labile du G_1P non métabolisé est dosé photocolorimétriquement à 650 m μ . L'histidine inhibe la phosphatase alcaline et révèle la P.G mutase.

REACTIFS

- Tampon tris 0,1 M de pH 9,1 : Dissoudre 1,21 g de tris

(hydroxyméthylaminaméthane) dans 10 ml HCl 0,1 N et q.s.p. 100 ml d'eau distillée.

- *Solution de substrat* : Dissoudre 40 mg de glucose 1 phosphate disodique 4 H₂O et 200 mg de Mg Cl₂, 6 H₂O dans 100 ml de tampon (stable une semaine à 4° C. Congeler).
- *Solution d'histidine* : Dissoudre 400 mg de L histidine monohydrochlorhydrate dans q.s.p. 10 ml d'eau distillée.
- *Acide trichloracétique* : 5 pour cent.
- *H₂SO₄2N* : 1 vol H₂SO₄ concentré + 17 vol. d'eau.
- *Solution de molybdate d'ammonium à 5 %* : Dissoudre 5 g de molybdate d'ammonium à 4 H₂O dans q.s.p. 100 ml d'eau.
- *Agent réducteur* : Dissoudre 3 g de bisulfite de sodium dans 20 ml d'eau. Ajouter 50 mg d'acide 1 amino-2 naphтол-4 sulfonique en agitant. Compléter par 100 mg de sulfite de sodium anhydre et bien agiter pour dissoudre. Préparer chaque semaine et conserver dans un flacon coloré.
- *Solution mère de phosphate* : Dissoudre 136 mg de phosphate monopotassique (PO₄H₂K) dans un litre d'eau. Conserver avec quelques gouttes de chloroforme.
- *Solution diluée de phosphate* : Diluer 10 ml de solution mère dans q.s.p. 100 ml d'eau.

MODE OPERATOIRE

Dans chaque essai E, mélanger : 1 ml de substrat 0,4 ml de solution d'histidine. Mettre les tubes au bain-marie 5' à 37° C. Ajouter 0,1 ml d'enzyme. Agiter.

Incuber 1/4 d'heure et 1/2 heure à 37° C. Ajouter 4,5 ml de CCl₃COOH à 5%. Agiter. Laisser 5' à la température de la pièce. Centrifuger 10' à 10.

Prélever 2 ml de surnageant et ajouter dans cet ordre : 2,6 ml d'H₂SO₄2N - 0,2 ml de molybdate - 0,2 ml d'agent réducteur. Agiter entre chaque addition. Chauffer à 100° C pendant 5'. Refroidir et lire à 650 mμ. Filtre vert.

Faire un *témoïn* de coloration pour chaque essai : 0,4 ml d'eau distillée, 4 ml CCl_3COOH , 0,1 ml d'enzyme, 1 ml de substrat. Ne pas incuber et centrifuger. Régler au maximum de déviation de la gamme.

T.E. = % de substrat métabolisé - pas d'hémolyse - stable 8 h - petite perte d'activité après deux jours à + 4° C.

L'ETALONNAGE

Est réalisé en répartissant dans une gamme de tubes 0 - 0,2 - 0,4 1,8 - 2 ml de solution diluée de phosphate et 2 - 1,8 - 1,6 ml de surnageant des essais en fin d'incubation.

RESULTATS

Les résultats concernant la phosphoglucomutase figurent au tableau IX pour les expériences in vitro, ceux des expériences in vivo figurent au tableau X.

Dans les deux cas, les anthocyanosides inhibent l'activité phosphoglucomutase économe ainsi les réserves glycogéniques. Signalons aussi que la phosphoglucomutase avait été décelée dans la rétine de lapin par LOWRY et coll. (115). Nous mettons en évidence une activité phosphoglucomutase quatre fois plus forte chez le porc que chez le lapin. KUWABARA et COGAN (102) ont signalé la forte teneur en glycogène de la rétine de lapin et de cobaye et la faible teneur en cette substance des rétines humaines et de celles des autres espèces animales.

Tableau IX

ACTIVITE PHOSPHOGLUCOMUTASIQUE : P.G.M.

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de porc après addition in vitro d'anthocyanosides

HOMOGENATS AU				1/200		1/400	
				M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	15 MINUTES	ANTHOCYANOSIDES (mg par essai)	0,0	39	6	18	8
			0,5	31	12	14	6
			1,0	27	13	9	6
	30 MINUTES		0,0	51	9	30	12
			0,5	40	10	24	7
			1,0	40	11	17	5

Tableau X

ACTIVITE PHOSPHOGLUCOMUTASIQUE : P.G.M.

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de lapin après deux injections intra-veineuses d'anthocyanosides (100 mg par kg) à 24 heures d'intervalle

HOMOGENATS AU			1/50		1/100		1/200	
			M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	15 MINUTES	Témoins	39	5	17	5	9	1,6
		Traités	21	4	12	0,8	6	0,8
	30 MINUTES	Témoins	47	1,6	23	0,8	10	1,6
		Traités	39	7	17	4	10	6

ACTIVITÉ 5 NUCLEOTIDASIQUE (A.M. Pase)

(3 - 1 - 3 - 5)

La 5 nucléotidase ou adénosine monophosphatase (A.M. Pase) décompose l'adénosine monophosphate (A.M.P.) en phosphate et en adénosine selon la réaction :



REISS a trouvé l'enzyme dans la rétine, les tissus nerveux, la prostate (150) (154).

Plus tard, on montra que l'activité la plus forte dans les tissus humains était dans la glande pituitaire postérieure (155) (2). D'après ce que l'on sait, aucune préparation de 5 nucléotidase n'a été hautement purifiée et les informations concernant les propriétés moléculaires de ces enzymes manquent.

PRINCIPE

L'activité 5 nucléotidasique spécifique est appréciée selon la récente technique de CAMPBELL 1962 (37). Le phosphate libéré après incubation est dosé photocolorimétriquement selon la technique de FISKE & SUBBAROW (65). La nucléotidase présente un optimum à pH 7,5. L'interférence avec la phosphatase alcaline est levée par une double détermination dont l'une en présence de nickel élimine la 5 nucléotidase.

REACTIFS

- *Solution de sulfate de manganèse 20 mM (PM = 169,01) :*
Solution aqueuse à 3,3802 g p. litre.
- *Solution de tampon barbital 40 mM.* Ajuster à pH 7,5 avec HCl (8,248 g/l).
- *Solution d'adénosine 5 monophosphate disodique (A.M.P. Na₂) 10 mM (PM = 411) (4,11 mg/ml).*
- *Solution de chlorure de nickel 0,1 M : (PM = 237,70) (23,77 g/l)*
- *Solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100*
- *Solution de molybdate acide d'ammonium à 5% dans SO₄H₂*
3N molybdate d'ammonium 5 g, SO₄H₂ concentré 14,7 g, eau distillée q.s.p. 100 ml
- *Réactif de FISKE & SUBBAROW à l' amino naphтол : Acide 1-amino-2-naphтол-4-sulfonique 0,2 g, métabisulfite de sodium 12 g, sulfite anhydre de sodium 1,2 g, eau distillée q.s.p. 100 ml.*
- *Solution aqueuse de phosphate monopotassique à 0,5 mM par litre (PM = 136,09)*

MODE OPERATOIRE

Incuber à 37° C, le temps désiré, deux séries de tubes A et B, contenant respectivement :

- *Série A :* 0,2 ml de préparation enzymatique, 0,1 ml de solution de sulfate de manganèse, 1,5 ml de tampon barbital, 0,2 ml de solution d'A.M.P.
- *Série B :* 0,2 ml de préparation enzymatique, 0,1 ml de solution de manganèse, 0,2 ml de solution de chlorure de nickel, 1,3 ml de tampon barbital, 0,2 ml de solution d'A.M.P.

Déféquer en fin d'incubation par 2 ml de solution d'acide trichloracétique. Prélever 2 ml de surnageant. Doser le phosphate selon FISKE & SUBBAROW, ajouter à chaque prise d'essai, 1 ml de molybdate d'ammonium en milieu sulfurique, puis 4 ml d'eau, 0,5 ml de réactif de FISKE et de l'eau distillée q.s.p. 10 ml Lire cinq minutes après à 650 m μ . L'activité 5-nucléotidasique spécifique est représentée par la différence entre les valeurs données par la série A et celles données par la série B.

L'ETALONNAGE

Est obtenu avec la solution de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ à 0,5 mM/litre. Mettre dans une gamme de tubes 0 - 0,2 - 0,4 1,5 - 2,0 ml de cette solution et compléter à 2 ml avec de l'eau distillée, dans chaque tube, traiter comme les 2 ml de surnageant (coloration avec la méthode de FISKE).

RESULTATS

Les résultats concernant l'activité 5 nucléotidasique spécifique au niveau de la rétine de porc figurent au tableau XI.

Cette activité 5-nucléotidasique est diminuée de façon notable par les anthocyanosides. Une diminution du taux d'activité de cette enzyme avait été notée dans ce Laboratoire, en fonction de l'âge au niveau de la rétine, du corps vitré (15) et de la cornée de bovidés JONADET 1965 (92).

Dans l'oeil humain, REISS en 1951 (155) trouve que la 5-nucléotidase est plus active dans la rétine et la choroïde que dans l'iris et le corps ciliaire; elle est absente dans le vitré. Chez le lapin, la répartition est la même avec toutefois une activité enzymatique six fois plus élevée au niveau de la choroïde. AKIYA et coll. 1958 (3) rencontrent une activité 5-nucléotidasique dans la rétine de boeuf, elle est plus élevée dans les microsomes que dans les mitochondries et dans les noyaux.

MASIMA 1958 (116), chez le lapin et le boeuf, a étudié dans les cellules visuelles et les différentes parties de la rétine, les changements des activités A.M.P. asique et A.T.P. asique sous différentes conditions d'éclairement. Chez le lapin, SHIONOYA 1960 (171) injecte quotidiennement par voie veineuse durant 20 jours, 20 à 45 mg/kg d'iodate de sodium. La 5-nucléotidase de la rétine diminue durant les deux premiers jours mais augmente de nouveau les jours suivants. La succino déshydrogénase est fortement abaissée. Dans l'étude histochimique de l'A.M.P. ase, des milieux oculaires des vertébrés, LESSEL et KUWABARA 1964 (107) notent chez veau, lapin, porc, chien, cobaye, homme, par ordre d'activité enzymatique décroissante : choroïde, segments externes, rétine, épithélium pigmenté, rétine, épithélium ciliaire, iris, épithélium cornéen, conjonctive.

Tableau XI

ACTIVITE 5-NUCLEOTIDASIQUE : A.M.P. ase

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de porc après addition in vitro d'anthocyanosides

HOMOGENATS AU				1/50		1/100		1/200		
				M	α	M	α	M	α	
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	30 MINUTES	ANTHOCYANOSIDES (mg par essai)	0, 0	24, 0	1, 0	12, 0	0, 4	6, 0	3, 2	
			0, 1	22, 5	2, 5	12, 5	0, 6	5, 6	0, 7	
			0, 5	21, 5	2, 1	8, 8	1, 1	1, 0	0, 6	
			1, 0	14, 8	2, 7	2, 7	1, 0	1, 3	0, 6	
	60 MINUTES		0, 0	46, 1	2, 4	3, 5	1, 1	11, 3	1, 2	
			0, 1	47, 8	2, 9	24, 0	1, 4	11, 2	0, 6	
			0, 5	43, 3	2, 0	16, 1	2, 4	11, 0	1, 2	
			1, 0	29, 3	3, 8	5, 3	1, 0	1, 3	0, 3	

ACTIVITE GLUCOSE 6 PHOSPHATASIQUE (G₆ Pase)

(3 - 1 - 3 - 9)

La glucose 6 phosphatase fut découverte par FANTIL & ROME (60) en 1945. En 1951 HERS et coll. démontrèrent que la glucose 6 phosphatase est une enzyme des microsomes. Partant du fait que l'activité était associée à une fraction microsomienne, de nombreux essais de purification de l'enzyme ont été faits (84) (55) (178) (103).

Cette enzyme a été isolée dans le foie de rat par SWANSOW (177) qui en montra l'étroite spécificité.

PRINCIPE

L'activité G-6-P asique est appréciée d'après une modification de la méthode de SWANSON (177). Après incubation de l'homogénat à 37° C, en présence de tampon maléate de pH 6,5 le phosphate, libéré du G-6-P par l'action de l'enzyme est dosé photolorimétriquement selon la technique de FISKE & SUBBAROW (66).

REACTIFS

- G-6-P 0,02 M : Prélever dans un tube à centrifuger 260 mg de G-6-P Ba 7 H₂O ajouter 2 ml d'eau et HCl N q.s.p., dissoudre, triturer à l'aide d'un agitateur. Ajouter 4,6 ml de solution aqueuse de sulfate de soude anhydre à 5 p. 100, centrifuger, vérifier si l'on a précipitation totale par

une nouvelle addition de solution de SO_4Na_2 . Quand cela est atteint, prélever le surnageant, l'amener à pH 6,5 par NaOH N et diluer à 25 ml avec de l'eau distillée. Conserver à -30°C .

- *Tampon de pH 6,5* : Dissoudre 116 mg d'acide maléique dans 5 ml d'eau. Amener la solution à pH 6,5 par NaOH N et porter le volume à 10 ml avec de l'eau distillée. Conserver à $+4^\circ\text{C}$.
- *Préparation enzymatique* : Effectuer l'homogénat dans l'eau glacée, le centrifuger 5 minutes à moins de 1.800 tours par minute.
- *Acide trichloracétique* : Solution aqueuse à 10 p. 100
- *Solution de molybdate acide d'ammonium* à 5 p. 100 dans SO_4H_2 3N, mélanger : molybdate d'ammonium 5 g., SO_4H_2 concentré 14,7 g., eau distillée q.s.p. 100 ml.
- *Réactif de FISKE & SUBBAROW à l'amino-naphtol* : Mélanger : acide 1 amino 2-naphtol 4 sulfonique 0,2 g., métabisulfite de sodium 12 g., sulfite anhydre de sodium 1,2 g., eau distillée q.s.p. 100 ml. Porter le tout 10 minutes à l'homogénéiseur Virtis 45 Conserver à l'abri de la lumière.
- *Solution Etalon* : Solution aqueuse de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{H}$ à 218 mg par litre (50 mg de P par ml).

MODE OPERATOIRE

Pratiquer l'incubation durant 30 à 60 minutes, dans un bain-marie maintenu à $+37^\circ\text{C}$ par un thermostat "Thermomix 2" avec une série de tubes contenant : 0,5 ml de substrat, 0,4 ml de tampon et 0,1 ml de préparation enzymatique.

En fin d'incubation, déféquer par addition d'un ml de solution d'acide trichloracétique et porter, durant 5 minutes, au bain de glace, puis centrifuger. Prélever 0,31 ml de surnageant, ajouter eau q.s.p. 1 ml, puis 1 ml de solution de molybdate d'ammonium en milieu sulfurique, puis 3 ml d'eau distillée q.s.p. 10 ml. Après 5 minutes de repos, effectuer la lecture au photocolorimètre à 650 m μ .

ETALONNAGE

Réaliser l'étalonnage à l'aide de la solution aqueuse étalon de phosphate monopotassique à 218 mg par litre, dont les volumes de 0 - 0,1 - 0,9 - 1 ml additionnés de 1 - 0,9 - 0,1 - 0 ml d'eau, seront additionnés d'1 ml de solution de molybdate d'ammonium etc Ces solutions correspondront respectivement à 0 - 10 90 - 100 p. 100 d'hydrolyse.

RESULTATS

Les résultats concernant l'activité glucose 6 phosphatase (G-6-P ase) au niveau de la rétine de porc en présence ou absence d'anthocyanosides in vitro figurent au tableau XII; ceux des expériences in vivo sur la rétine de lapin sont consignés au tableau XIII.

Nous notons que les anthocyanosides augmentent légèrement l'activité glucose 6 phosphatase au niveau de la rétine. Notons aussi que chez le porc, cette activité glucose-6-phosphatase est deux fois plus faible que chez le lapin.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux trouvés par KUWABARA (52) qui constate chez le porc une très faible concentration en glycogène, alors que chez le lapin, le taux est plus élevé.

Une étude histochimique permettant la localisation de cette enzyme au niveau des tissus oculaires a été poursuivie par différents auteurs. Ainsi, PENA-CARRILLO 1963 (144) décèle la présence de G-6-P ase dans le stroma et l'épithélium cornéen chez le lapin. SHANTHAVERAPPA & BOURNE 1964 (168) montrent également une activité glucose-6-phosphatase au niveau des tissus suivants: conjonctive, cornée, sclérotique, choroïde, rétine. La même année, LESSEL & KUWABARA travaillant sur de nombreuses espèces homme, veau, porc, chien, chat, lapin (107) montrent l'existence d'une activité glucose-6-phosphatase au niveau de la cornée en particulier de l'épithélium et au niveau de la rétine en

particulier dans l'épithélium pigmentaire et la couche ple-xiforme.

En 1966, BASTIDE, TRONCHE et DASTUGUE (13) constatent une activité glucose-6-phosphatasique notable au niveau de la rétine de bovidés, cette activité est supérieure à celle que ces mêmes auteurs ont constatée sur les humeurs aqueuse et vitrée.

Tableau XII

ACTIVITE GLUCOSE 6 PHOSPHATASIQUE

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de porcs après addition in vitro d'anthocyanosides

HOMOGENATS AU				1/5		1/10	
				M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Heures)	8 HEURES	ANTHOCYANOSIDES (mg par essai)	0,0	10,0	1,6	5,5	0,6
			0,1	12,1	1,6	7,0	1,1
			0,5	13,0	2,0	6,7	1,1
			1,0	13,1	1,7	7,5	1,6
	16 HEURES		0,0	37,2	3,5	22,1	2,9
			0,1	49,1	8,1	27,0	4,8
			0,5	49,1	8,2	28,1	3,3
			1,0	45,0	7,1	25,0	3,7

Tableau XIII

ACTIVITE GLUCOSE 6 PHOSPHATASIQUE

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de lapin après deux injections intra-veineuses d'anthocyanosides (100 mg par kg) à 24 heures d'intervalle.

HOMOGENATS AU			1/5		1/10	
			M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Heures)	2 HEURES	Témoins	19,0	0,8	8,1	0,8
		Traités	21,1	2,4	11,0	2,0
	4 HEURES	Témoins	39,0	2,0	17,0	2,0
		Traités	39,1	5,1	17,1	3,1

ACTIVITE PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASIQUE (P H I)

(5 - 3 - 1 - 9)

La phosphoglucose isomérase, qui aboutit à l'équilibre entre glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate, fut mise en évidence par LOHMANN dans les extraits de muscle, coeur, rein, foie et cerveau, TANKO (179) et plus tard SOMERS et CROSBY (173) découvrirent la présence de cette enzyme dans la farine de pois. L'isomérase est aussi présente dans le sérum de différentes espèces animales dont l'homme (24). On a étudié aussi la phosphoglucose isomérase des érythrocytes humains (188).

BODANSKY observe une augmentation de l'activité PHI dans les états hémomytiques, les affections hépatiques et certaines tumeurs avec métastase (25).

Nous dosons la phosphohexose isomérase selon la technique de BODANSKY (25). Cette méthode mesure le taux de conversion à pH 7,4 et à 37° C de glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate.

Nous avons étudié dans le laboratoire de Chimie Biologique et Pharmacodynamie la répartition de la PHI dans le placenta humain, les sangs de la mère et du nouveau-né et dans la série animale BASTIDE (11).

REACTIFS

- *Substrat* : Mettre 0,391 grammes du G_6P Ba 7 H_2O dans un tube à centrifuger, ajouter 2 ml d'eau distillée. Agiter avec une baguette de verre, faire dissoudre le précipité

par HCl N/10. Triturer 5 minutes, ajouter 4 ml de solution de SO_4Na_2 anhydre à 5 p. 100 pour précipiter le Ba. Triturer, centrifuger. Vérifier que le surnageant ne précipite plus en ajoutant une goutte de SO_4Na_2 . Prélever le surnageant. Ajuster à pH 7,4 par NaOH H, compléter à 25 ml.

- *Tampon* : Véronal acétate : 0,714 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
14,714 g de tampon 24 ml d'HCl N/10; prendre le pH. Ajuster à pH 7,4. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 200 ml. Agiter. Répartir en flacons plastique. Congeler.
- *Solution diluée de FeCl_3* : Mélanger 2,1 ml de FeCl_3 à 28 p. 100 et de l'eau distillée jusqu'à 100 ml. Prendre 0,1 ml de FeCl_3 , compléter à 100 ml par HCl N/10.

TECHNIQUE

Dans chaque essai, mélanger 0,3 ml de solution enzymatique, 2 ml de substrat tamponné. Mettre les tubes au bain-marie à 37° C pour une incubation de 5 et 15 minutes.

Ajouter 2,5 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Agiter, centrifuger. Doser le fructose converti par la méthode de ROE; prélever 2 ml de surnageant, 2 ml d'une solution à 0,1 p. 100 de résorcinol dans l'alcool absolu, 6 ml de solution de FeCl_3 diluée dans HCl 10N.

Porter au bain-marie à 80° pendant 8 minutes. Refroidir sous l'eau courante. Apprécier la coloration au photocolormètre à 480 m μ .

Faire un témoin de coloration pour chaque essai; dans ce témoin, mélanger 0,5 ml de solution enzymatique, 2 ml de tampon, 2,5 ml de $\text{CCl}_3 - \text{COOH}$. Centrifuger, continuer comme les essais.

Un témoin maximum dans ce témoin, mélanger 2,5 ml de solution tampon et 2,5 ml de $\text{CCl}_3 \text{COOH}$, centrifuger et finir le dosage comme les essais

ETALONNAGE

Une gamme étalon est établie avec une solution de fructose à 0,0005 M. Dans une gamme de tubes, mélanger 0 - 0,2 - 0,4 1,8 - 2 ml de solution de fructose à 90 mg/l et 2,0 - 1,8 - 1,6 0,2 - 0 ml d'eau distillée. Traiter ces tubes par la méthode de ROE.

RESULTATS

Les résultats concernant la phosphoglucose isomérase figurent au tableau XIV pour les expériences in vitro, ceux des expériences in vivo figurent au tableau XV.

D'après ces tableaux, nous constatons que les anthocyanosides in vitro stimulent très faiblement l'activité phosphohexose isomérase puisqu'un homogénat au 1/1000 présente après incubation de 5 minutes, une activité de 24,2 sans anthocyanosides alors que les mêmes conditions mais en présence d'anthocyanosides dans le milieu réactionnel, l'activité est de 25,4.

Au contraire, les expériences effectuées in vivo prouvent que l'activité phosphohexise isomérasiqne est légèrement dépressée par les anthocyanosides puisqu'un homogénat au 1/500 présente une activité de 31,2 chez un témoin après une incubation de 5 minutes alors qu'un homogénat à la même concentration chez un traité et après le même temps d'incubation présente une activité de 29,8. Au niveau de l'oeil BASTIDE et coll. ont étudié la phosphohexose isomérase au niveau de l'humeur aqueuse et du corps vitré chez les bovidés (14). Plus tard DASTUGUE et coll. étudient cette enzyme au niveau de la rétine de bovidés (50).

Tableau XIV

ACTIVITE PHOSPHOHEXOSE ISOMERASIQUE (PHI)

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de porc après addition in vitro d'anthocyanosides (80 rétines)

HOMOGENATS AU				1/1000		1/2000		1/4000	
				M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	5 MINUTES		0,0	24,2	2,0	15,1	2,0	9,8	1,1
			0,1	24,1	2,4	15,3	1,7	10,2	1,2
			0,5	25,4	2,0	16,2	1,6	10,4	1,2
	15 MINUTES		0,0	28,5	1,9	23,5	1,3	16,1	1,7
			0,1	29,3	2,3	21,6	2,1	16,3	2,2
			0,5	30,2	1,8	22,1	1,8	16,1	1,7

Tableau XV

ACTIVITE PHOSPHOHEXOSE ISOMERASIQUE (PHI)

Pourcentages de substrat métabolisé par les homogénats de rétines de lapin après deux injections intra-veineuses d'anthocyanosides (100 mg par kg) à 24 heures d'intervalle (28 rétines)

HOMOGENATS AU			1 / 500		1/1000		1/2000	
			M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	5 MINUT.	Témoins	31,2	3,4	21,2	4,4	14,1	3,3
		Traités	29,8	3,9	18,7	3,5	13,8	1,4
	15 MINUT.	Témoins	33,1	3,9	30,1	3,9	22,4	3,7
		Traités	32,9	4,9	28,8	3,2	20,9	2,2

ACTIVITE A-T-PASIQUE (AT Pase)

Nous avons recherché l'activité A-T-Pasique de la rétine de lapin dans des conditions expérimentales particulières à savoir à l'obscurité. Les animaux d'expérience sont placés à l'obscurité totale une demi-heure avant l'expérimentation. Les essais sont effectués sur des lapins "Fauve de Bourgogne" soumis à un régime normal. L'activité A-T-Pasique est déterminée sur 6 lapins soit 12 rétines. Les lapins sont tués par saignée après ouverture de la carotide, les yeux sont immédiatement prélevés et nous procédons à la préparation des homogénats puis des dilutions.

L'activité A-T-Pasique est recherchée par la méthode de PERRY modifiée par DASTUGUE.

PRINCIPE

Basé sur la réaction suivante :



L'adénosine triphosphate est dosé en estimant colorimétriquement le phosphate inorganique libéré par l'enzyme à partir de l'ATP en présence d'ions Ca et sous certaines conditions expérimentales.

REACTIFS

- A.T.P. 0,05 M (3,1 mg de P par ml) sel sodique à pH 6,8

(0,3115 g/10 ml). Cette solution peut être conservée à - 15° de nombreux mois sans hydrolyse appréciable

- *Tampon glycolle-soude* 0,2 M à pH 9,1 à 25° selon SORENSEN
 Solution A : solution de glycolle 0,2 M (15,01 g/l)
 Solution B : Na OH 0,2 M (8 g/l) exempte de phosphate.
 Mélanger 50 ml de A et 10,2 ml de B et compléter à 200 ml avec de l'eau distillée. Ajuster à pH 9,1.
- *Chlorure de Ca* 0,1 M à 11,1 g/l
- *Acide trichloracétique* à 15 p. 100
- *Solution de Molybdate acide d'ammonium* à 5 p. 100 dans SO_4H_2 3 N. Mélanger molybdate d'ammonium 5 g SO_4H_2 concentré 14,7 g, eau distillée q.s.p. 100 ml.
- *Réactif de FISKE & SUBBAROW* à l' amino naphthol
 Acide-1-amino-2-naphthol-4-sulfonique 0,2 g - Métabisulfite de sodium 12 g - Sulfite anhydre de sodium 1,2 g - eau distillée q.s p. 100 g

MODE OPERATOIRE

Préparer 2 témoins (non incubés) :

- *Témoin n° 1* (réglage du photocolorimètre) - 1 ml de solution tampon glycolle de pH 9,1, -0,2 ml de solution de Ca Cl_2 , -0,5 ml d'eau distillée et 0,3 ml de solution de substrat A.T.P.
- *Témoin n° 2* (présence éventuelle de phosphore dans la préparation) - 1 ml de solution tampon glycolle de pH 9,1 - 0,2 ml de Ca Cl_2 - 0,5 ml de préparation enzymatique et 0,3 ml d' H_2O .
- *Chaque essai* (activité enzymatique) 1 ml de tampon glycolle - 0,2 ml de Ca Cl_2 - 0,5 ml enzyme - 0,3 ml de substrat A.T.P.
- *Témoin n° 3* (activité spontanée) - 1 ml de tampon glycolle - 0,2 ml de Ca Cl_2 - 0,5 ml H_2O et 0,3 ml de substrat A.T.P.

Au terme de l'incubation, ajouter dans tous les tubes (essais et témoins) 1 ml de CCl_3COOH , agiter, laisser en contact 10 mn, centrifuger. Prélever 0,33 ml de surnageant, ajouter q.s.p. 1 ml H_2O (0,67 ml H_2 - 1 ml molybdate - 3 ml H_2O - 0,5 ml de Fiske et 4,5 ml H_2O). Agiter, laisser reposer 5 mn. lire au photocolorimètre sous 650 m μ .

ETALONNAGE

L'étalonnage se fait avec de 0 à 1 ml d'une solution de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (à 218 mg par litre soit 50 g par ml).

RESULTATS

Les résultats sont consignés dans un tableau indiquant les mêmes constantes que pour les activités enzymatiques précédemment étudiées.

Signalons que l'activité A.T.Pasique avait été recherchée dans le laboratoire dans des conditions d'éclairement normales et avait été trouvée négative dans les rétines de lapin. Cependant devant les quantités très faibles d'A.T.Pase nous avons pensé qu'une comparaison avec des résultats obtenus sur des rétines de lapins traités aux anthocyanosides comme nous avons procédé pour les activités précédemment étudiées. Nous avons donc limité nos recherches à une mise en évidence de cette activité A.T.Pasique.

De nombreux auteurs se sont intéressés à l'activité A.T. Pasique rétinienne; certains ont tenté une localisation de l'enzyme, parmi ceux-ci DFUCHI (139) (149), OISHI (141), MITARAI (126), KANEKO (94), SCARPELLI (163).

D'autres ont recherché l'activité A.T.Pasique dans des conditions d'éclairement variable et l'hydrolyse de l'A.T.Pase. EZUKA (59) étudie l'influence de la lumière sur le métabolisme du phosphate de la rétine de grenouille adaptée à la lumière. Dans un autre travail (60) ce même auteur conclue que l'A.T.P.

a une relation très intime avec la photochimie de la rétine. ROBERT (158) étudiant la vitesse d'hydrolyse de l'A.T.P. dans les bâtonnets de rétines de porc, conclue que celle-ci est le même après adaptation à la lumière ou à l'obscurité.

FRANCK sur le même animal trouve comme enzyme responsable de l'hydrolyse de l'A.T.P. des enzymes séparées de la rodopsine qui ne sont pas spécifiquement localisées dans les bâtonnets des segments externes, mais qui sont dispersés dans toute la rétine.

Pour MAZIMA (120) sur des rétines de lapin albinos grâce à de nombreuses coupes histochimiques, cet auteur essayant de clarifier les rapports entre rhodopsine et A.T.Pase dans les segments des cellules visuelles, arrive à la conclusion suivante : il n'y a aucune relation entre rhodopsine et A.T.Pase.

Certains auteurs étudient l'activité de l'A.T.P. en fonction du développement de la rétine chez le rat (27) (185).

D'autres encore (116) provoquent une dégénérescence rétinienne expérimentale par du iodate de sodium, observant grâce à l'électromicroscope les variations de l'A.T.Pase rétinienne.

Les résultats concernant l'A.T.Pase de la rétine de lapin sont consignés dans le tableau XVI. Nous pouvons remarquer que l'A.T.Pase quoiqu'en quantités faibles n'est trouvée que chez les lapins mis à l'obscurité totale une demi-heure avant le sacrifice.

Tableau XVI

ACTIVITE A.T.PASIQUE DE LA RETINE DE LAPIN

HOMOGENATS DE		RETINE 1/10		FOIE 1/5		REIN 1/5	
		M	α	M	α	M	α
TEMPS D'INCUBATION (Minutes)	15 MIN.	5,0	1,3	16,0	1,0	22,0	1,7
	30 MIN.	8,0	0,5	21,0	2,2	38,0	1,4

Chapitre III

RESUME ET CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

RESUME ET CONCLUSIONS

Nous résumons dans le tableau ci-après les résultats obtenus dans ce travail.

ACTIVITE	L.D.H.	H.B.D.H.	6P.G. dh	G.P. dh	P.G.M.	5 NUCLEO- TIDASE	G ₆ Pase	P.H.I.
IN VITRO	↗	↗	↗	↗	↘	↘	↗	↗
IN VIVO	↗	↗			↘		↗	↘

Seules les activités phosphoglucomutase et 5-nucléotidasique sont légèrement dépressées par les anthocyanosides IN VIVO et IN VITRO. L'activité phosphohexoseisomérase est stimulée IN VITRO et dépressée IN VIVO.

Il n'existe pratiquement pas de données bibliographiques sur l'effet des glycosides d'anthocyanes sur les réactions enzymatiques, cependant l'examen du métabolisme rétinien chez les mammifères a conduit EUTTERMAN & KINOSHITA (57) LEVENE et al (108) à admettre que la rétine utilise le glucose essentiellement par la glycolyse et subsidiairement par le cycle citrique alors que le métabolisme lipidique ne joue pratiquement ici qu'un faible rôle énergétique. D'après DUKE FLDER le rôle du shunt des hexoses monophosphates dans l'uti-

lisation rétinienne du glucose, de moyenne importance dans les conditions normales, devient plus marqué dans les processus pathologiques, en particulier, au niveau des cellules visuelles où il est plus électivement localisé. Dans une récente étude histo-enzymologique des enzymes rétiniennes de lapins ayant reçu des anthocyanosides, il a été montré (194) que les modifications métaboliques de la rétine portaient non pas seulement sur l'alcool déshydrogénase qui présente alors une teneur élevée, mais sur toute une série d'activités enzymatiques, un effet spécifique des anthocyanosides résidant dans la stimulation de la lactase déshydrogénase, de l'acide lipoïde déshydrogénase et de l'alcool déshydrogénase. Ce sont quelques uns de ces résultats entrevus par voie histoenzymobiochimique macroscopique tant in vitro qu'in vivo.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ADAMS (RG), HAGINS (WA) : Biol Bull; Woods hole 1960
119 300
- (2) AHMED (Z), REISS (JL) : B J 1958 69 386
- (3) AKIYA (S), ISHIGURO (K), KANEKO (R) : Acta Soc Ophthal
Jap Tokyo 1958 62 979
- (4) ALFIERI (B), SOLE (P) : C R Soc Biol, Paris 1964
158 2338
- (5) ALFIERI (B), SOLE (P) : C R Soc Biol, Paris 1964
158 2338
- (6) ALFIERI (B), SOLE (P) : Soc Biol Clermont-Ferrand
15 Juin 1966
- (7) AMBROSE (AM) et de EDDS (F) : J. Pharmacol. Exp. Ther.
1947 90 359 - Fed Proc 1947 6 306
- (8) BACHELERIE (B) : Thèse Médecine, Clermont-Ferrand 1966
- (9) BASTIDE (P) : Rapport d'expertise toxicologique pharmaco-
logique du C 147 A (communication personnelle)
- (10) BASTIDE (P), BAUDON (J), DASTUGUE (G), REBIERE (JP) :
Ann Biol Clin 1960 18 307
- (11) BASTIDE (P), BAUDON (J), MEUNIER (Th), DASTUGUE (G) :
Pathol. Biol 1962 10 445
- (12) BASTIDE (P), ROUHER (F), TRONCHE (P) : Soc Ophthal. du
Midi de la France - Séance du 31 Mars 1968. Bulletin des
sociétés d'Ophthalmologie de France
- (13) BASTIDE (P), TRONCHE (P), DASTUGUE (G) : C R Soc Biol.,
1966 160 318
- (14) BASTIDE (P), TRONCHE (P), MEUNIER (Th), BALLADE (Ch),
DASTUGUE (G) : 11ème Congrès Soc Pharm Sud Loire Tou-
louse 30 Juin 1961

- (15) BASTIDE (P), TRONCHE (P), SOULA (MC), DASTUGUE (G) :
Path. Biol., 1967, 15 5-6 265
- (16) BAUM (JL) : Arch. Ophthal. 1963 70 59-68
- (17) BEACH (VL), STEINETZ (BG) : J. Pharmacol. Exp. Ther.
1961 131
- (18) BEISENTHEIRTZ (G), BUCHER (Th), GARBADE (KH) : Méthode
in Enzymology, 1955 1 391
- (19) BEISENTHEIRTZ (G), BOLTZE (HJ), BUCHNER (Th), CZOK (B),
GARBADE (KH), MEYER ARENDI (E), PFEIDERER (G) :
Z Naturforsch., 1953 B 555
- (20) BELLEOUD LELVAN BOYER : Rev. Méd. Aéron. Spat., 1966
5 18 45
- (21) BELLEOUD LELVAN BOYER : Rev. Méd. Aéron. Spat., 1967
6 23 5
- (22) BERARDINIS (E de) : Rass Ital Ottal., 1953 22 345
- (23) BIETTI (GB) : Rapport d'expertise clinique 19 Janvier
1965
- (24) BODANSKY (O) : J.B.C., 1953 202 829
- (25) BODANSKY (O) : Cander, 1954 7 1191
- (26) BODANSKY (O) : Dans Greenberg DM et Harper HA
Enzymes in Health and disease Ch Thomas Springfield,
1960 13 269
- (27) BONAVITA (V), GUARNERI (R), PONTE (P) : Expérientia,
1966 22 720
- (28) BONAVITA (V), PONTE (F), AMORE (G) : Vision Res., 1963
5 7 8 271
- (29) BONAVITA (V), PONTE (F), AMORE (G) : Mat. Nat , 1963
34 6 710
- (30) BONNET (L) : Thèse pour le Doctorat en Chirurgie Den-
taire, 1969
- (31) BONTING (SL), CARAGGIO (LL), CANADY (MB) : Exp. Eye Res
1964 3 47
- (32) BONTING (SL), BANGHAM (AD) : Biochemistry of the Eye
symp. Castle August 1966 493

- (33) BOULANGER (P) : Exp. Ann Bioch. Méd., 1944 4 169
- (34) BUELL (HV), LOWRY (OH), ROBERTS (NR), CHANG (MW),
KAPPMANN (JI) : J.B.C., 1958 232 979
- (35) CABAUD (PG), WROBLEMSKY (F) : Ann J. Clin. Path., 1958
80 234
- (36) CALABRIA (GA), ORZALES (N) : Boll Soc. Ital Biol.
Sper, 1964 40 1671
- (37) CAMPBELL (DH) : J. 1962 62 34
- (38) CENTANNI (L) : Rass Ital Ottal, 1955 24 371
- (39) CHABLIER (R), HOSSLET (A), COLOT (M) : Arch Int Physiol Bioch, 1963 71 p. 1
- (40) CHIBRET (M) : Thèse pour le Doctorat en Pharmacie
Clermont-Ferrand, 1969
- (41) COGAN (DC), KUWAGARA (T) : Trans Amer Ophthal Soc 1959
57 153
- (42) COHEN (BB) : Proc Soc Exptl Biol Méd, 1959 101 405
- (43) CORI (GF), COLOWICK (SP), CORI (GT) : J B.C., 1937
121 465
- (44) CORI (GF), COLOWICK (SP), CORI (GT) : J.B.C., 1938
124 543
- (45) CORI (GF), COLOWICK (SP), CORI (GT) : J.B.C., 1938
123 375
- (46) CORI (GF), CORI (GT) : Proc Soc Exptl Bio Méd, 1936
34 702
- (47) COTEREAU (y) : Maloine Ed Paris 1947
- (48) COURTOIS (JE), PERLES (R) : Précis de chimie Biologique
t₁ et t₁₁, 1965 Masson
- (49) CUVELLIER (R), TERRASSE (J), DERICKE (C), ANDRAUD (G) :
Sem. Hop Paris, Pathologie et Biologie
- (50) DASTUGUE (G), BALLADE (G), BASTIDE (J) : C R Soc Biol,
1963 CLVII 3 540
- (51) DELBRUCH (R), SHIMASSEK (M), BARTSCH (K), BUCHER (Th) :
Biochem Z, 1959 331 297

- (52) DELBRUCH (A), ZELE (E), BUCHER (Th) : Biochem Z, 1959
331 273
- (53) DEMURE (G) : Thèse de Médecine Clermont-Ferrand, 1964
- (54) DICKENS (F), GLOCK (GE) : B.J., 1952 50 81
- (55) DUVE (C de), BERTHET (J), HERS (HG), DURRET (L) :
Bull Soc Chim Biol, 1949 31 1242
- (56) ERANKO (O), WIEMI (M), MERENNIES (E) : The structure
of the eye édité by GK Smelser Acedemic Press New York,
1961 159
- (57) EUTTERMAN (S), KINOSHITA (JM) : J.B.C. 234 723
- (58) EVERSON (AG) : Structure of eye Proc Symposium New Yrok
1961 53
- (59) EZUKA (K) : Jap J Ophthal, 1957 1 1 12
- (60) EZUKA (K) : C R Arch Øphthal Paris, 1956 16 8 838
- (61) FABIANEK (J) : Ann Nutrit Alim, 1961 15 p. 67
- (62) FAIR (B), BAIRN (JW) : Acad press 1959
- (63) FANTIL (P), ROME (MN) : Australian J exptl Biol Med Sci.
1945 23 20
- (64) FISHER (CL), NIXON (JC) : Clin Biochem, 1967 1 34
- (65) FISKE (Ch), SUBBAROW (Y) : J B.C., 1925 66 375
- (66) FISKE (Ch), SUBBAROW (Y) : J.B.C., 1929 81 629
- (67) FORGACS (J) : Expèrientia, 1963 19 236
- (68) FRANK (RN), GOLSMITH (Th) : Arch Biochem Biophys, 1965
110 517
- (69) GALLI (A) : C₁₁₆ C Expertise toxicologique et pharmaco-
logique
- (70) GALLI (A) : C₁₁₆ C Expertise toxicologique et pharmaco-
logique
- (71) GIL DEL RIO (De) : Arch Soc Oftal Hisp Amer, 1966 26
969
- (72) GLOCK (GE), Mc LEAN (P) : Biochem J., 1954 56 171

- (73) GLORIA (E), PERLA (A) : Ann Ottal, 1966 92 8 595
- (74) GRAYMORE (C) : Exp Eye Pres, 1964 3 1 5
- (75) GRAYMORE (C), TOWLSON (M) : Exp Eye Res 2 1 48 1963
- (76) GREENBERG (LS), GLICK (O) : J.B.C., 1960 235 3028
- (77) GRIGNOLO (A), ORZALESI (N), CALABRIA (G) : Exp Eye Res, 1966 5 86
- (78) HAGINS (WA), ADAMS (RG) : Excerpta Med Intern Cong Series, 1962 48 2 970
- (79) HAGINS (Wa), JENNINGS (Wh) : Disc Faraday Soc, 1960 27 180
- (80) HAGINS (WA), ZONANA (HV), ADAMS (RG) : Nature, 1962 194 844
- (81) HANO (K), MATSUHITA (K) : Communication personnelle Mars 1966
- (82) HEATH (E) : J.B.C., 1944 155 333
- (83) HECHT (S), SHAER (S), PIRENNE (MH) : J. Genet Physiol 1942 25 819
- (84) HERS (HG), BERTHET (J), BERTHET (L), DUVE (C de) : Bull Soc Chim Biol, 1951 33 21
- (85) HORECKER (BL), SMYRNIOTIS (PZ) : B.B.A., 1950 29 222
- (86) HORECKER (BL), SMYRNIOTIS (PZ), SEEGMILLER (JE) : J.B.C., 1951 193 383
- (87) HUBARD (R) : J. Gen Physiol, 1956 39 923
- (88) ICE (HC), WEI DER (SH) : J Amer Chem Soc, 1953 75 50
- (89) JAYLE (GE), AUBAY (M) : AnnnOculist Paris, 1965 198 6 556
- (90) JAYLE (GE) : C₁₁₆ C Expertise chimique
- (91) JAYLE (GE), AUBERT (L) : Thérapie, 1964 19 1 171
- (92) JONADET (M) : Thèse de Doctorat d'Etat Pharmacie Clermont-Ferrand, 1967
- (93) KALK (H), SCHMIDT (E), SCHMIDT (FW), WILDHIRT (E) : Clin Wochschr, 1959 37 657

- (94) KANEKO (R) : Acta Soc Ophthal Jap, 1960 64 978
- (95) KARLI (P) : Ann Histo chim, 1957 2 34
- (96) KARNOUSKY (MJ), HIMMELHOCH (SB) : Amer J. Physiol, 1961 201 781
- (97) KARRER (P), WIDMER (R) : Helv Chim Acta, 1927 10 5
- (98) KIMURA (E) : Japon J Physiol, 1952 3 35
- (99) KINOSHITA (H) : A M A Arch Ophthalm, 1963 70 558
- (100) KORNBERG (A), HORECKER (BL) : Methods in Enzymogy ac Press N.Y., 1955 1 323
- (101) KUWABARA (T), COGAN (O) : J. Histochem Cytochem, 1960 8 214
- (102) KUWABARA (T), COGAN (O) : Ann Histo chim, 1963 8 223
- (103) LANGDON (RG), WEAKLEY (DR) : Communication personnelle
- (104) LAVOLLAY (J), NEUMANN (J) : Exp Ann Biochim Méd., 1949 10 59 - Traité de Biochimie Générale Masson Ed. Paris 1962
- (105) 2 F L 349
- (106) LEFEBURE (P), SALMON (J), LECOMTE (J), VAN CAUWENBERGE (M) : C R Soc Biol, 1962 156
- (107) LESSEL (A), KUWABARA (T) : Arch Ophthal, 1964 71 851
- (108) LEVENE (R), HORTON (G), EINAUGLER (R) : Arch Ophthal, 1964 72 99
- (109) LIEBMANN (PA) : Biophys J., 1962 2 162
- (110) LIPMANN (P) : Nature 1936 138 588
- (111) LOHR (GW), WALLER (HD) : Klin Wochschr, 1959 37 833
- (112) LOWRY (OH) : Biochemistry of Dvlping Nervous Syst Proc First Int term Neurochem Symposium, 1954 350 7
- (113) LOWRY (OH), LEWIS (C), ROBERTS (NB) : J B.C., 1956 7 329
- (114) LOWRY (OH), ROBERTS (NB), LEWIS (C) : J. B.C., 1956 220 879

- (115) LOWRY (OH), ROBERTS (NB), SCHULZ (DW), GLOW (JE),
CLARK (JR) : J. B. C., 1961 236 2813
- (116) HASIMA (Y) : Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1958
62 185
- (117) MARCOLLET (M), BASTIDE (P), TRONCHE (P) : C R Soc Biol., 1969 163 1786
- (118) MARKET (LL), MOLLER (F) : Proc Natl Acad Sci US, 1959
45 753
- (119) MATSUDA (H) : Folia Ophthal Japon, 1967 18 526
- (120) MAZIMA (T) : Acta Soc Ophthal Japon, 1966 70 1424
- (121) MAZIMA (T) : Folia Ophthal Jap, 1966 17 307
- (122) MAZIMA (T), MIZUMO (K) : Folia Ophthal Jap, 1967
18 1 14
- (123) MEIER RUGE (VW), CERLETTI (A) : Ophthalmologica, 1966
151 512
- (124) MERCIER (A), PERDRIEL (G) : Bull Soc Ophthal Fr., 1965
65 1049
- (125) MERCIER (A), PERDRIEL (G), CARVES (M) : Rapport d'ex-
pertise clinique, Juin 1964 et Rev. Méd. Aéronaut.,
1965 4 13 57
- (126) MITARAI (G), SUGGITA (Y) : Nippon Ganka Gakkai
Zasshi, 1957 61 1325
- (127) MIZUKO (K) : Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1964
68 11 1567
- (128) MORONE (G) : Ann Ottal Clin Ocul, 1964 9 482
- (129) N..... : Brevet (France) n° 1300869 brevets spéciaux
de médicaments n° 1369 M 2881 M et 5097 M Brevet USA
n° 3254000
- (130) N..... : "Les anthocyanosides" Laboratoires Chibret
Clermont-Ferrand, 1963
- (131) N..... : "Pourpranyl" Revue Chibret, 1964 n° 42
- (132) N..... : "Pourpranyl Difrarel" Revue Chibret, 1964
n° 42bis

- (133) NACHLAS (MM), MARGULISS (S), SELIGMAN (AM) : J. B. C., 1960 235 499
- (134) NASU (N), APPONI (G), VIALE (GL) : Z Zellforsch, 1962 56 188
- (135) NEWELL (PW), KURIMOTO (S) : Brit S Ophthal, 1963 47 10 596
- (136) NIEMI (M), MERENNIS (E) : J Neurochem, 1961 6 200
- (137) NIKKILA (EA), PITKAN (E) : Acta Endocrinol, 1959 31 573
- (138) NISSELBAUM (JS), BODANSKY (O) : J. B. C., 1961 236 323
- (139) OFUCHI (Y) : Soc Ophthal Jap, 1967 71 9 1339
- (140) OFUCHI (Y) : Folia Ophthal, 1968 19 5 543
- (141) OISHI (T) : Jap J Ophthal, 1968 12 2 51
- (142) PEARSE (AG), REISS (JL) : B. J. 1952 50 634
- (143) PEARSE (AG) : In structure of the Eye Edited by K. Smelser Academic Press New York, 1961 53
- (144) PENA CARILLO (J) : Arch Soc Oftal Hisp Amer, 1963 23 533
- (145) PFERCH (C), KARL (P) : C R Soc Biol, 1963 157 365
- (146) PITAVY (S) : Thèse de Médecine Clermont-Ferrand, 1967
- (147) POURRAT (M), TRONCHE (P), Mme POURRAT (A) : Bull Soc Chim, 1966 6 1918
- (148) POURRAT (M), BASTIDE (P), DORIER (P), Mme POURRAT (A), TRONCHE (P) : Chim Therm, 1967 1 1 33
- (149) RADDING (GM), WALD (G) : J. Gen. Physiol, 1956 39 923
- (150) REISS (JL) : Bull Soc Chim Biol, 1934 16 385
- (151) REISS (JL) : Enzymologia, 1937 2 110
- (152) REISS (JL) : Enzymologia, 1937 2 183
- (153) REISS (JL) : Enzymologia, 1938 5 251

- (154) REISS (JL) : Bull Soc Chim Biol, 1940 22 36
- (155) REISS (JL) : J. Ophthal, 1951 35 149
- (156) REYNOLDS (TM), ROBINSON (B) : J. Chem Soc, 1934 1039
- (157) RITCHER (S), VETTER (K) : Arch Ophthal, 1964 2 167
2 145
- (158) ROBERT (N), GOLDSMITH (F) : Arch Biochem Biophys,
1965 3 517
- (159) ROMEUF (JC) : Thèse de Doctorat Médecine Clermont-
Ferrand, 1967
- (160) ROSENBERG (B) : Photochem Photobiol, 1962 1 117
- (161) ROUHER (F) : C₁₁₆ C Expertise clinique
- (162) ROUHER (F), SOLE (P) : Communication personnelle
- (163) SCARPELLI (DG), CRAIG (EL) : J Cell Biol, 1963
17 2 279
- (164) SCHIMKE (RT), SCHMIDT (FW), WILDHIAT (E) : Klin
Walhschr, 1959 37 657
- (165) SCIALDONE (D) : Ann Ottal, 1966 92 1 43
- (166) SEEGER (WH) : Sciences, 1966 151 841
- (167) SEVIN (R), OVENDET (JF) : Ophthalmologica Basel, 1966
152 109
- (168) SHANTHAVEERAPPA (TB), BOURNE (GH) : Acta Anat, 1964
57 192
- (169) SHANTHAVEERAPPA (TB), BOURNE (GH) : Histochemie, 1964
3 413
- (170) SHIMIZU (N), MAEDA (S) : Ana rec, 1963 IIb 427
- (171) SHIONOYA (K) : Acta Soc Ophthal Jap Tokyo, 1960
64 612
- (172) SIDMAN (RL), WISLOCKI (GB) : J. Histochem Cytochem,
1954 2 413
- (173) SOHERS (GT), CROSBY (EL) : A B B., 1945 6 295
- (174) STRAUB (FB) : B.J., 1940 34 483

- (175) SUOMALAINEN (H), ERIKSSON (C) : Lebensmittel Untersuch
U Forsch, 1960 122
- (176) SUOMALAINEN (H), KERANEN (AJ) : Nature Lond, 1961 191
498
- (177) SWANSON (MA) : Fédération Proceed, 1949 8 258
- (178) SWANSON (MA) : J.B.C., 184 647
- (179) TANKO (B) : B.J., 1936 30 692
- (180) TAYEAU (F) : Exp Soc Fr Paris, 1954 - Actual Biol,
1954 1 635
- (181) TERRASSE (J) : Rapport d'expertise clinique 23 Février
1963
- (182) TERRASSE (J), MOINADE (S) : Press Med, 1964 72 7 397
- (183) THOMAS (C), BARRISTAN (C), MONROSE (P) : Bull Soc Oph-
thal Fr, 1965 65 212
- (184) THUNBERG (T) : Skand Arch Physiol, 1920 40
- (185) TOWLSON (MJ) : Nature 1964 201 4916 295
- (186) TRONCHE (P), BASTIDE (P), KOMOR (J) : C R Soc Biol,
1967 161 24
- (187) TRONCHE (P), BASTIDE (P), KOMOR (J) : C R Soc Biol,
1967 161 1995
- (188) TSUBOI (KK), ESTRADA (J), HIDSON (PB) : J.B.C., 1958
231 19
- (189) UYEDA (Y) : Folia Ophthal Jap, 1966 17 282
- (190) VECCHIONE (L), POLZELLA (A), RINALDI (E), TIERI (O) :
Bull Soc Ital Biol Sper, 1962 38 185
- (191) VOLPI (U), BERTHONI (G) : Ann Ottal, 1964 90 9 492
- (192) WALD (G) : Science, 1965 150 1028
- (193) WARBURG (O), CHRISTIAN (W), CREISE (A) : Biochem Z.,
1935 282 157
- (194) WEGMANN (R), MAEDA (K), TRONCHE (P), BASTIDE (P) : Ann
Histochem, 1969 14 237

- (195) WIELAND (T), PFLEIDERER (G) : Biochem Z, 1957 329
112
- (196) WIELAND (T), PFLEIDERER (G), ORTANDERL (F) : Biochem Z
1959 331 103
- (197) WILLSTATTER (R), ZOLLINGER (EH) : Liebig's Ann Chem,
1915 408 83 et 1917 412 195
- (198) WISLOCKI (GB), SIDMAN (RL) : Anat Rec, 1952 113 540
- (199) WITMER (R), HIRSH-HOFFMANN (AM) : Bull Soc Franc Oph-
thal, 1967 8 392
- (200) YOUNG (HL), PACE (N) : B B A., 1958 76 112

